

**A ENDOSCOPIA DE CONTACTO UTILIZADA POR CLÍNICOS.  
CONTRIBUIÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DO CANCRO NA  
MUCOSA ORAL HUMANA.**

**ALBERTO MANUEL DO NASCIMENTO SANTOS**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina**

**na especialidade de Cirurgia e Morfologia Humana**

**na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas**

**Setembro, 2016**

**A ENDOSCOPIA DE CONTACTO UTILIZADA POR CLÍNICOS.  
CONTRIBUIÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DO CANCRO NA  
MUCOSA ORAL HUMANA.**

**Alberto Manuel do Nascimento Santos**

**Orientador: Miguel Correia; Professor Catedrático**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na especialidade de Cirurgia e Morfologia Humana**

**Setembro, 2016**



Este trabalho foi apresentado ao Conselho Científico da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Medicina, especialidade de Cirurgia e Morfologia Humana



Aos meus pais.

À minha mulher e à minha filha.

À minha madrinha Maria Augusta.



# **PUBLICAÇÕES: ENDOSCOPIA DE CONTACTO**

## **PUBLICAÇÕES EM REVISTAS INDEXADAS**

Andrea M, Dias O, Santos A. Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995; 104: 3339.

*Esta referência foi citada por 18 artigos em revistas indexadas.*

Andrea M, Dias O, Santos A (1995) Contact endoscopy of the vocal cord. Normal and pathological patterns. Acta Otolaryngol (Stockh) 115:314–316.

*Esta referência foi citada por 18 artigos em revistas indexadas.*

Andrea M, Dias O, Macor C, Santos A, Varandas J. Contact endoscopy of the nasal mucosa. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 117: 307-311.

*Esta referência foi citada por 11 artigos em revistas indexadas.*

## **ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

### **RESPOSTA À PRIMEIRA REVISÃO**

Santos A, Galrito M, Barona T, Papoila A, Fonseca I, Salvado F. Oral Cancer Early Diagnosis – The Contribution of Contact Endoscopy. Otolaryngology-Head And Neck Surgery.

*(Apresentado como comunicação oral no Congresso da Academia Americana de Otorrinolaringologia em Orlando, 2014).*

## EM FASE DE EXECUÇÃO E ENVIO

Alberto Santos, Marta Galrito, Teresa Barona, Jorge Varandas, João Subtil, José Saraiva, Carlos Macor. Endoscopia de contacto- complemento da clinica e da anatomia patológica no diagnostico precoce do cancro da mucosa oral. Acta médica.

## PUBLICAÇÕES / CONFERENCE PROCEEDINGS EM REVISTAS INDEXADAS

Andrea M, Dias O, Santos A, Gouveia V, Azevedo L. Gastro esophageal reflux disease - alterations of the epithelium of the larynx observed by contact-endoscopy. European archives of otorhinolaryngology. 2000; (suppl 1) Vol.257 (s-33): 33.

Andrea M, Dias O, Santos A, Macor C, Figueiredo F. Rigid and contact endoscopy in early malignant lesions of the larynx. European archives of otorhinolaryngology. 2000; (suppl 1) Vol.257 (s-33): 32.

Andrea M, Dias O, Santos A, Macor C, Luis L, Simão M. Rigid and contact endoscopy in laryngeal papilloma. European archives of otorhinolaryngology. 2000; (suppl 1) Vol.257 (s-33): 32.

Santos A, Simão M, Santos A.R, Dias O, Correia M, Andrea M. Contact endoscopy - contribution for chronic rhinitis evaluation. Otolaryngology-head and neck surgery. 2005; Vol.132: 141-2.

Santos A, macor C, Camacho I, Santos A, Gerente M, Azevedo L, Almeida M, Dias O, Andreia M. Staging laryngeal carcinoma assessment by rigid and contact endoscopy. European archives of otorhinolaryngology. 2005; (suppl 1) Dez Vol.264: 102.

Santos A, Amaral J, Barros M, Macor C, Dias O, Andrea M. Contact endoscopy in early diagnosis of oral and soft palate lesions. European archives of otorhinolaryngology. 2007; (suppl 1) 264 (s5-s151): 122.

*Prémio “Best poster in oncology” - Congresso Europeu Otorrinolaringologia Viena 2007.*  
*3º Prémio na especialidade head and neck - Congresso Europeu Otorrinolaringologia Viena 2007.*

Santos A, Amaral J, Ravasqueira A, Barros M, Macor C, Dias O, Andrea M. Chronic allergic rhinitis assessment by contact endoscopy. European archives of otorhinolaryngology. 2007; (suppl 1) 264(s265-s364): 335.

Santos A, Gaspar A, Barros M, Macor C, Dias O, Andrea M. Contact endoscopy assessment in nasopharyngeal carcinoma. Otolaryngology-head and neck surgery. 2007; Vol.137 n2s: 231-2.

Santos A, Amaral J, Gaspar I, Barros M, Macor C, Dias O, Andrea M. Contact endoscopy in early diagnosis of oral and soft palate lesions. European archives of otorhinolaryngology. 2007; suppl. 1 264 (s5-s151).

Sokolova A, Santos A, Amaral J, Dias O, Andrea M, Barbosa M. Contact endoscopy in the assessment of chronic rhinitis. Allergy. 2008; Vol.63 (suppl) 88: 343-4.

*Prémio “New Tools” in diagnosis - Congresso Europeu Imunoalergologia Barcelona 2008*

Santos A, Galrito M, Barona T, Papoila A, Fonseca I, Salvado, Macor C. Oral Cancer-earlier diagnosis- contribution of contact endoscopy. Otolaryngology-Head And Neck Surgery. 2014; Vol.132: 141-2.

## **PUBLICAÇÕES / CONFERENCE PROCEEDINGS EM LIVRO**

Andrea M, Dias O, Paço J, Santos A. Vocal Cord Assement, Rigid and Contact Endoscopy Associated to Microlaryngeal surgery - 3rd International proceedings - Congress of Head and Neck Cancer (1994), Elsevier, 233-36.

Santos A, Gerente M Azevedo L, Simão M, Dias O, Andrea M. Contact Endoscopy, Contribution for the Diagnosis and Follow Up of Nasopharynx Carcinoma – International Proceedings of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery, 5th European Congress. (2004), Medimond, 223-27.



# AGRADECIMENTOS

Apenas com a colaboração de muitas pessoas foi possível a conclusão desta tese. Estou certo que, por lapso meu, alguns agradecimentos não serão feitos ou não serão expressos como mereciam. A essas pessoas apresento o meu pedido de desculpas mas também o meu inominado e sincero agradecimento.

Agradeço:

Ao Senhor Professor Doutor Miguel Correia, meu orientador de tese, que ao longo de vários anos me guiou pelas actividades académicas e de investigação, tendo sempre possibilitado o meu trabalho nas áreas da morfologia, que julgámos mais interessantes e mais integradas na minha actividade clínica. A sua confiança em mim foi sempre determinante e muito motivadora;

Ao Senhor Professor Doutor João Paço, que sempre teve uma palavra de confiança e um conselho no momento certo para me fazer avançar de forma eficaz e efectiva na execução destes trabalhos. O seu saber, o seu dinamismo e a sua capacidade de organização e de mobilização, em especial na grande instituição onde trabalho, é para mim uma fonte constante de motivação, de inspiração e de autoconfiança;

Ao Senhor Dr. Carlos Macor por toda a confiança em mim depositada e pelo desafio que me apresentou com o seu projecto global do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-facial do Hospital Beatriz Ângelo e em particular com a Consulta Multidisciplinar de Patologia Oral, que representa um passo importante para a melhoria das condições assistenciais aos doentes e, que foi fundamental à consolidação dos dados desta tese. As suas capacidades de chefia, médico-cirúrgicas e humanas, representam para mim uma referência e um decisivo apoio na minha actividade médico-cirúrgica e científica;

Ao Senhor Dr. José Saraiva que, desde a minha formação como interno da especialidade, tem marcado e influenciado de forma indelével a minha vida profissional. Proporcionou-me todas as oportunidades médico-cirúrgicas e científicas das quais destaco a participação e a organização de reuniões científicas, decisivas nesta fase da minha vida académica; o seu saber médico-cirúrgico e as suas qualidades ímpares na organização e na gestão de trabalho em equipa, muito motivam e enriquecem a minha capacidade de trabalho e a minha actividade médico-cirúrgica;

Ao Senhor Professor Doutor Mário Andrea, meu mestre de Otorrinolaringologia que me possibilitou toda a experiência com a endoscopia de contacto. Permitiu-me vivências profissionais ímpares no domínio científico, médico-cirúrgico e da relação médico-doente e sempre estimulou a minha dedicação à otorrinolaringologia e o meu inconformismo quanto ao saber;

À Senhora Professora Doutora Teresa Barona por todo o seu apoio, estímulo e orientação na elaboração dos estudos; pelo desafio constante na actividade docente dos últimos anos;

Ao Senhor Professor Miguel Seabra, grande entusiasta e empreendedor da Ciência, que sempre me motivou e orientou para a realização destes estudos;

Ao Senhor Professor Nascimento Ferreira, meu primeiro Mestre da Morfologia, que ao convidar-me para integrar o seu departamento como monitor de Biologia Celular e Histologia, quando eu ainda era aluno do segundo ano de Medicina desta Faculdade, iniciou a minha vida académica como docente. Sempre foi para mim uma referência e um apoio que me permitiu trabalhar nesta Faculdade com uma grande alegria e motivação. É o maior responsável por tanto amar o ensino e esta Faculdade;

Ao Senhor Professor Doutor Francisco Salvado, pelo seu incondicional apoio à Consulta Multidisciplinar de Patologia Oral e pelos interessantes e motivadores desafios científicos;

À Senhora Dra. Marta Galrito, grande entusiasta da endoscopia de contacto, imprescindível para a realização desta tese; pela energia, entusiasmo e grande capacidade de trabalho que sempre colocou na colaboração da realização destes estudos, pela coordenação da vertente de Medicina Oral da Consulta Multidisciplinar, por todo o seu apoio prático na observação dos doentes e pela ajuda na elaboração da base de dados da consulta;

Ao Senhor Professor Doutor Óscar Dias pela vivência e experiência com a endoscopia de contacto e pelos seus ensinamentos técnicos e científicos;

Ao Senhor Professor Doutor António Jacinto pela confiança que em mim depositou e pelo muito que motivou a minha actividade docente;

À Senhora Professora Doutora Teresa Rodrigues por todo o seu apoio e orientação no tratamento estatístico dos resultados deste estudo;

À Senhora Professora Doutora Ana Papoila por ter inicialmente orientado a estruturação da componente estatística e pelo tratamento estatístico dos resultados preliminares deste estudo;

À Senhora Professora Doutora Inês Vingado pela orientação na discussão de resultados estatísticos e pelo apoio incondicional neste domínio;

Ao Senhor Dr. Jorge Varandas, uma referência profissional e um apoio, um desafio e uma motivação incontornáveis; pela sua ajuda na discussão e revisão dos textos desta tese;

Ao Senhor Dr. João Subtil pelo seu apoio na discussão de temas desta tese; pela incitação para o

envolvimento em projectos sempre interessantes e motivadores e, por representar um desafio constante, alicerçado numa energia muito produtiva e contagiante;

Ao Senhor Dr. Marco Simão por toda a ajuda na pesquisa bibliográfica bem como por todo o apoio e disponibilidade incondicional;

À Senhora Dra. Isabel Fonseca pela colaboração da consulta de Dermatologia na Consulta Multidisciplinar de Patologia Oral, por toda a sua disponibilidade e pelo seu apoio permanente;

À Senhora Dra. Cecília Caldas por toda a colaboração, por todo o apoio e por todo o seu saber colocado à nossa disposição para a avaliação dos doentes da consulta multidisciplinar de patologia oral;

Ao Senhor Dr. Paulo Palmela um dos primeiros entusiastas à criação da Consulta Multidisciplinar de Patologia Oral;

À Senhora Dra. Maria João Cruz, grande amiga, por todo o incentivo e imprescindível apoio na revisão dos textos desta tese;

À minha grande amiga Filipa Laires, pela determinante ajuda na formatação dos textos e fotos desta monografia;

À Administração e à Direcção Clínica do Hospital Beatriz Ângelo, na pessoa do Senhor Professor Doutor Rui Maio, por todo o apoio e incentivo concedidos;

A todos os meus colegas do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Beatriz Ângelo e do Departamento de Tecidos, Células e Moléculas da Faculdade de Ciências Médicas, pelo incondicional apoio;

A todos os meus colegas do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Cuf Descobertas, por todo o seu apoio e incentivo; destacando a Senhora Dra. Ana Jardim pelo apoio na discussão das questões epidemiológicas e ajuda na pesquisa bibliográfica e o Senhor Dr. João Pedro Araújo, pelo apoio geral e, em particular, na obtenção de artigos científicos;

A todos os Enfermeiros do Hospital Beatriz Ângelo, por todo o apoio concedido;

À minha filha Bárbara e à minha mulher Paula, pela imensa paciência e grande tolerância bem como pela efectiva ajuda na correcção dos textos destes estudos;

Aos doentes, que são o objectivo primordial de todos os progressos médicos e serão sempre a única razão da existência desta nobre arte que é a Medicina



# RESUMO

O cancro da mucosa oral apresenta alta incidência em todo o mundo e, apesar de todos os progressos na área do diagnóstico e da terapêutica, continua a ter um mau prognóstico. Considerando o grande contraste entre a taxa de sobrevivência aos 5 anos, associada aos tumores de estádios iniciais (T1 e T2) e a atribuída aos tumores de estádios mais avançados (T3 e T4), a pouca eficácia do diagnóstico precoce apresenta-se como a principal causa do insucesso terapêutico, situação que se revela pouco lógica num órgão de tão fácil acesso, quer ao doente quer ao médico. Algumas destas lesões malignas aparecem em áreas da mucosa aparentemente sãs, enquanto outras parecem desenvolver-se a partir de lesões pré-existentes, denominadas potencialmente malignas. Todas as lesões ou condições potencialmente malignas possuem um risco e um período temporal muito variável em que podem malignizar, por isso, a identificação destas lesões implica sempre um longo seguimento destes doentes. Algumas das lesões potencialmente malignas são de grandes dimensões ou multifocais, sendo importante a decisão sobre a localização da biópsia e o número de biópsias a realizar para garantir com alguma segurança, que não deixamos de detectar uma lesão maligna. Admite-se assim, a necessidade de uma técnica que possa complementar a observação clínica, para tentar melhorar o diagnóstico e o seguimento destes doentes considerados de risco. Neste estudo, propusemo-nos avaliar a capacidade da endoscopia de contacto para detectar lesões malignas na mucosa oral e também, definir estratégias para o procedimento e interpretação dos resultados, com o objectivo de assegurar uma maior eficácia, uma melhor comparação de resultados entre equipas multicêntricas e uma simplificação dos critérios de diagnóstico, de forma a garantir que, com a mesma segurança, a técnica possa ser utilizada por clínicos sem formação anatomo-patológica específica.

A endoscopia de contacto baseou-se na colpocitoscopia descrita pelo ginecologista Hamou, tendo o Professor Mário Andrea e o Professor Óscar Dias adaptado a sua aplicação no território Otorrinolaringológico, primeiro na laringe e, posteriormente, nas outras mucosas. Inicialmente foi utilizado o endoscópio ginecológico e, mais tarde sob a orientação destes investigadores, foram desenvolvidos endoscópios adaptados para estas mucosas que facilitaram bastante a realização da técnica e melhoraram a qualidade das imagens obtidas.

A endoscopia de contacto é uma técnica não invasiva, que permite observar *in vivo*, as células das camadas superficiais do epitélio e a microcirculação subepitelial, permitindo caracterizar alguns aspectos morfológicos e funcionais no domínio celular e vascular da mucosa oral. Esta observação, permite o acesso às células vivas no seu ambiente natural, não estando por isso sujeitas aos artefactos típicos da técnica histológica.

A endoscopia de contacto, quando comparada com o exame anatomopatológico, demonstrou, no nosso estudo, ter capacidade discriminativa e preditiva suficiente para ser considerada um bom teste para detectar malignidade na mucosa oral. Os valores que suportam esta competência são: a sensibilidade de 96,7% (IC 95% : 0,833-0,994), a especificidade de 97,5% (IC,95% - 0,928-0,991), o valor preditivo do positivo de 90,6% (IC95%-0,758-0,968) e o valor preditivo do negativo de 99,1% (IC95%-0,953-0,998), associados a uma razão de verosimilhança do positivo de 38,022, com uma razão de verosimilhança do negativo de 0,03, uma exactidão de 97,3% (IC95%-0,933-0,989) e uma análise de concordância com um índice Kappa de 0.908 ( $p < 0,001$ ).

A definição da estratégia e dos critérios de diagnóstico de malignidade, realizado por endoscopia de contacto, são muito importantes. Nesse sentido, lançámos uma proposta com base na nossa experiência e suportada pelos resultados obtidos neste estudo. Considerámos dois padrões de diagnóstico: o celular e o vascular. Para confirmar o diagnóstico de malignidade basta que um deles seja compatível com malignidade. O padrão celular é composto por vários achados ou factores celulares que dividimos, com base nas mesmas premissas, em major e minor:

a) Factores de diagnóstico major: A heterogeneidade geral tecidular; a forma e dimensões dos núcleos alteradas; a relação núcleo/citoplasma alterada e irregular; a hiperqueratose irregular e heterogénea.

b) Factores de diagnóstico minor - A observação de mitoses; a observação de nucléolos; o aumento e irregularidade da coloração nuclear.

O padrão vascular tem igualmente definidos factores de diagnóstico major e minor:

a) Factores de diagnóstico major: A heterogeneidade geral da arquitectura vascular; a alteração da forma dos vasos; a observação de microtromboses.

b) Factores de diagnóstico minor: A observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos.

Apoiados nas observações e nos resultados da nossa amostra, verificámos que os achados celulares e vasculares apresentam, como grupo de diagnóstico, uma óptima coesão e uma elevada consistência interna, como é suportado pelos resultados do coeficiente alfa de Cronbach, do respectivo *if item deleted* e da análise de cluasters. No entanto, existem achados celulares e vasculares que se destacam, pela sua importância individual, como defendido pelo teste de avaliação de árvores de decisão em que se identifica a heterogeneidade geral celular e vascular, como factores determinantes para o diagnóstico de malignidade.

Estes achados celulares e vasculares são fáceis de identificar por qualquer clínico e são os primeiros a ser observados no nosso protocolo de realização e decisão. Estes factos levam-nos a acreditar que esta técnica poderá ser utilizada por clínicos como complemento da observação macroscópica, realizada na consulta, podendo vir a constituir uma boa ajuda para melhorar a precocidade do diagnóstico do cancro na mucosa oral. Com base nestas premissas, acreditamos que a utilização da endoscopia de contacto por clínicos sem conhecimentos histológicos implicará uma curva de aprendizagem curta e sem riscos para o doente. Esta hipótese, é reforçada pelos resultados que obtivemos com um pequeno teste, onde avaliámos a capacidade de diagnóstico da endoscopia de contacto de 12 clínicos que, sem experiência com a técnica, registaram em média mais de 80% de diagnósticos certos.

Concluimos que, na nossa amostra, a endoscopia de contacto demonstrou capacidades para detectar malignidade na mucosa oral, baseando o seu diagnóstico na avaliação de achados celulares e vasculares major e minor e seguindo uma estratégia e um critério de decisão que se nos revela simples, de forma a permitir que a técnica possa ser utilizada, com segurança, por clínicos.





# ABSTRACT

Oral mucosa malignancies have a high worldwide prevalence and, in spite of all the developments in diagnosis and treatment protocols, still carry a low prognosis.

Comparing the survival rate at 5 years of initial stages of the disease (T1 and T2) with more advanced stages (T3 and T4), stresses out the feeble adequacy of our diagnostic skills to evaluate early stages of malignancy, more so on an organ that is easily assessed both by the patient and by the clinician.

Some of these malignancies develop in apparently healthy oral mucosal areas, whether in others they arise in pre-existing mucosal lesions, named as potentially malignant lesions.

All of these lesions have a risk of turning malignant over a very wide time span, this meaning that these patients have to adhere to a follow-up protocol that allows the diagnosis of very early stages of malignant disease.

Some of the potentially malignant lesions involve large areas of the mucosa, and some are multifocal, therefore making the decision process of the area to biopsy and/or what areas to biopsy, very important, not skipping areas that might prove further down the road to be malignant. So we admit the need of a technique that complements clinical evaluation, improving diagnostic skills and better follow-up assessments.

In our study we evaluated contact endoscopy as a technique that allows *in situ* and in real time the diagnosis of oral mucosa malignancies, but also we propose a procedure protocol and a strategy for results' evaluation, identifying diagnostic criteria, contributing to a better efficacy of results' comparison between different clinical centres, being performed by clinicians without specific histopathology background.

Contact endoscopy is based on the work in colpocitoscopy of Dr. Jacques Hamou, gynaecologist, having been adapted later to otorhinolaryngology territories by Professors Mário Andrea and Óscar Dias, initially on the larynx mucosa and posteriorly on other mucosa. At the beginning the gynaecology endoscope was used, but later,

under the guidance and specifications identified by these two investigators, specifically designed endoscopes for the ORL territories, allowing easier handling and better image quality, begun its use.

Contact endoscopy is a non-invasive technique that allows in vivo visualization of superficial epithelial cell layers and sub-epithelial microvasculature, identifying morphologic and some functional aspects of the mucosa, in our study of the oral mucosa. Being an in vivo assessment, some of the artefacts associated with histologic technique aren't present.

In our study, contact endoscopy when compared to histopathology, demonstrated to have discriminative and predictive capacity good enough to be used as an early oral mucosa malignancy diagnostic tool.

The results that support this statement are:

a sensitivity of 96,7% (CI 95% : 0,833-0,994); a specificity of 97,5% (CI 95% : 0,928-0,991); positive predictive value of 90,6% (CI 95% : 0,758-0,968) and a negative predictive value of 99,1% (CI 95% : 0,953-0,998), associated to a positive likelihood ratio of 38,022 with a negative likelihood ratio of 0,03, an accuracy of 97,3% (CI 95% : 0,933-0,989) and a kappa index 0,908 ( $p < 0,001$ )

The definition of the strategy and of the malignancy diagnostic criteria by contact endoscopy is extremely important.

Based on our clinical experience and on the results of the present study, we propose criteria to evaluate lesions and systematize results.

We consider two diagnostic patterns: cellular and vascular.

To confirm a lesion as malignant one of these two is enough.

The cellular pattern includes several morphologic findings, divided in their relative relevance as major or minor:

A) Major cellular diagnostic features – general heterogeneity of the epithelium; altered nuclear morphology and size; irregular nucleus / cytoplasm ratio; irregular and heterogeneous hyperkeratosis.

B) Minor cellular diagnostic features – observation of mitosis; observation of nucleolus; increased and irregular nucleus dyeing.

The vascular pattern also includes morphologic features, but as contact endoscopy is an *in vivo* evaluation, it allows functional aspects of the microvascularization:

A) Major vascular diagnostic features - general heterogeneity of the microvasculature; altered vessel morphology; the presence of microthrombosis.

B) Minor vascular diagnostic feature – out of vessel red blood cells.

We've identified, based on our observations and on the results of the present sample, that the cellular and vascular patterns show a great cohesion and high internal consistency, as supported by the results of Cronbach alpha index, of the "if item deleted" and cluster analyses. However some of these cellular and vascular patterns stand out by their individual importance, as supported by decision tree evaluation test, that confirms heterogeneity, both cellular and vascular, as decisive when establishing a malignancy diagnosis.

These cellular and vascular features are easily identified by any clinician, and are the first to include in our procedure and decision protocol. These aspects support our belief that contact endoscopy can be used as a complement to clinical observation on a consultation setting, contributing decisively to reduce the time to diagnosis on oral cancer.

Based on these premises we believe that contact endoscopy can be performed by clinicians without specific histology background, with a short learning curve and without posing any risks to the patient.

This hypothesis is supported by the results that we obtained with a small test passed to 12 clinicians, unfamiliar with the technique, with over 80% of correct diagnosis when evaluating images obtained by contact endoscopy.

We, therefore, concluded that, in our sample, contact endoscopy permits the detection *in vivo* of oral mucosa malignancy, based on the evaluation of cellular and vascular features, following a strategy and a defined evaluation protocol, granting a safe procedure diagnostic tool for everyday use.



# ÍNDICE

RESUMO	1
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	
<b>1.1. ENDOSCOPIA DE CONTACTO</b>	
1.1.1. Definição e história	17
1.1.2. Territórios de aplicação da técnica	19
1.1.3. Objectivos	28
<b>1.2. MUCOSA ORAL NORMAL</b>	
1.2.1. Embriologia	31
1.2.2. Morfologia	32
1.2.2.1. Epitélio da mucosa oral	33
1.2.2.2. Tecido conjuntivo da mucosa oral	37
1.2.2.3. Glândulas salivares minor da mucosa oral	38
1.2.2.4. Vasos da mucosa oral	41
1.2.2.5. Inervação da mucosa oral	42
1.2.3. Tipos de mucosa oral	42
1.2.3.1. Mucosa mastigatória	42
1.2.3.2. Mucosa de revestimento	44
1.2.3.3. Mucosa especializada	49

### **1.3. DOENÇAS POTENCIALMENTE MALIGNAS DA CAVIDADE ORAL**

1.3.1. Definição e Epidemiologia	53
1.3.2. Tipos de lesões potencialmente malignas	57
1.3.2.1. Leucoplasia	57
1.3.2.2. Eritroplasia	58
1.3.2.3. Lesões do palato - práticas aberrantes de tabagismo	59
1.3.2.4. Queilite actínica	59
1.3.3. Condições potencialmente malignas	60
1.3.3.1. Fibrose submucosa	60
1.3.3.2. Líquen plano	60
1.3.3.3. Lúpus eritematoso discóide	61
1.3.3.4. Disqueratose congénita	61
1.3.3.5. Imunodepressão	61
1.3.3.6. Candidíase hiperplástica crónica	62
1.3.3.7. Epidermólise bolhosa	62
1.3.3.8. Xeroderma pigmentosum	62
1.3.3.9. Queratoacantoma	62
1.3.3.10. Doença do enxerto-versus-hospedeiro	63

### **1.4. CANCRO DA MUCOSA ORAL**

1.4.1. Epidemiologia	65
1.4.2. Localização	66
1.4.3. Tipo histológico	66
1.4.4. Prognóstico	67

1.4.5. Prevenção	69
1.4.6. Diagnóstico	70
1.4.7. Terapêutica	70
<b>1.5. MUCOSA AERODIGESTIVA NORMAL</b>	
<b>- ESTUDOS PRELIMINARES À ENDOSCOPIA DE CONTACTO</b>	
1.5.1. Epitélio de revestimento	73
1.5.1.1. Queratinócitos	73
1.5.2. Outros tipos de células do epitélio de revestimento	83
1.5.2.1. Células de Merkel	83
1.5.2.2. Células de Langerhans	87
1.5.2.3. Melanócitos	90
1.5.3. Células Migrantes	93
1.5.4. Epitélio glandular	96
1.5.4.1. Sistema canalicular	96
1.5.4.2. Canais intercalares	97
1.5.4.3. Canais estriados	97
1.5.4.4. Canais excretores	99
1.5.5. Tecido conjuntivo	100

## CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS

### **2.1. MATERIAL E MÉTODOS**

2.1.1. População	105
2.1.2. Métodos	105
2.1.3. Execução da técnica	108
2.1.4. Avaliação da capacidade de clínicos para realizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	118
2.1.5. Material	119
2.1.6. Estudo estatístico	119

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### **3.1. ENDOSCOPIA DE CONTACTO- PADRÃO NORMAL DA MUCOSA ORAL**

3.1.1. Procedimento	125
3.1.2. Padrão de normalidade na observação por endoscopia de contacto	128
3.1.2.1. Lábio	128
3.1.2.2. Palato	132
3.1.2.3. Mucosa jugal	144
3.1.2.4. Mucosa do trígono retromolar	148
3.1.2.5. Mucosa do pavimento da boca	150
3.1.2.6. Mucosa da face ventral da língua	151



3.1.2.7. Mucosa da face dorsal da língua	154
3.1.2.8. Gengiva	158
<b>3.2. DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO</b>	
3.2.1. População do estudo: caracterização	161
3.2.2. Diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	165
3.2.2.1. Padrão celular de malignidade	167
3.2.2.2. Padrão vascular	185
3.2.2.3. Critérios de diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	197
3.2.2.4. Critério simplificado para diagnosticar malignidade mantendo a mesma segurança diagnóstica	199
3.2.2.5. Margens microscópicas e mapeamento das lesões	202
3.2.2.6. Avaliação da capacidade de clínicos para realizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	205

## CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PRESPECTIVA FUTURA

<b>4.1. DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO</b>	
4.1.1. Capacidade da observação por endoscopia de contacto de detetar malignidade	210
4.1.2. Critérios utilizados para realizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	215
4.1.2.1. Padrão celular de malignidade	215

4.1.2.2. Padrão vascular de malignidade	224
4.1.3. Critérios de diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto	228
4.1.4. Critérios mais simples para diagnosticar malignidade mantendo a segurança diagnóstica	229
4.1.5. Vantagens da endoscopia de contacto no diagnóstico de malignidade	230
4.1.6. Limitações da endoscopia de contacto no diagnóstico de malignidade	233
4.1.7. Avaliação do diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto por clínicos sem experiência com a técnica	237
4.1.8. Perspectivas futuras	238

## CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFIA

CAPÍTULO 1

# INTRODUÇÃO



# ENDOSCOPIA DE CONTACTO

## DEFINIÇÃO E HISTÓRIA

A endoscopia de contacto é uma técnica não invasiva que permite observar as células epiteliais e a microcirculação *in vivo*. Esta técnica inspirou-se na colpocitoscopia, descrita por Hamou em 1979 [1] para o estudo da mucosa vaginal e uterina. Embora tenha sido publicado um ensaio preliminar em 1989 sobre a utilização de um colpocistoscópio para observar lesões inflamatórias da boca, por uma equipa italiana chefiada por L'Estrange [2], a endoscopia de contacto começou a ser utilizada com esta denominação em Otorrinolaringologia na mucosa da laringe em 1993 pelo Professor Mário Andrea e pelo Professor Óscar Dias [3].

Os primeiros estudos de endoscopia de contacto na mucosa aerodigestiva foram realizados na laringe em 1993, por uma equipa chefiada pelo Professor Mário Andrea, a qual tive o privilégio de poder integrar. Foi utilizado um colpocitoscópio ginecológico que, apesar de implicar algumas limitações técnicas, tornou possível realizar observações *in vivo* e *in situ* com 60 e 150 aumentos. Os trabalhos preliminares mostraram os benefícios da endoscopia de contacto em situações normais e patológicas, nomeadamente tumorais, inflamatórias e papilomatoses [3].

A grande evolução permitida por esta técnica baseia-se na possibilidade de, em tempo real e *in situ*, ultrapassar a fronteira da observação macroscópica para passar a observar, a nível celular, situações normais ou patológicas. Acresce que esta informação não é confinada a uma pequena área, como acontece aquando da biópsia. Com a endoscopia de contacto podemos observar áreas extensas da mucosa de forma rápida e não invasiva. A informação obtida não é tão detalhada e discriminativa como no exame histopatológico mas, a endoscopia de contacto permite rastrear a mucosa de uma forma eficaz e, sem lesar os tecidos ou provocar qualquer incómodo para o doente [3,4,5].

Utilizando uma coloração vital denominada azul de metileno, conseguimos observar as células epiteliais com o citoplasma corado de azul claro e o núcleo corado de azul escuro. É possível avaliar características morfológicas dos núcleos, nomeadamente a forma, dimensões, limites e coloração. Podemos ainda detectar a presença de nucléolos

ou mitoses. A observação destas estruturas e da sua organização permite avaliar a integridade e sanidade do epitélio [3].

Ao contrário do que sucede no método histológico, esta observação não lesa as células, que são observadas vivas e no seu ambiente natural, sendo possível avaliar alguns aspectos fisiológicos como a descamação típica da renovação celular epitelial. A endoscopia de contacto permite-nos também o acesso à rede microvascular subepitelial e à cinética dos glóbulos vermelhos. A observação dos vasos não é possível pela coloração das suas paredes por azul de metileno mas pela coloração natural dos eritrócitos que, ao preencherem o interior das estruturas vasculares, nos revelam a sua forma e dimensões, para além de nos transmitirem outros dados dinâmicos sobre a circulação sanguínea. Devido a este contraste natural, os vasos podem ser observados mesmo sem coloração com azul de metileno. Os *ostia* das glândulas da mucosa podem igualmente ser observados permitindo o estudo da sua morfologia, fisiologia e cinética de excreção [3,4,5].

A aplicação da endoscopia de contacto no estudo da laringe ocorreu naturalmente como resposta à necessidade de obter mais informação sobre algumas doenças da laringe, nomeadamente, carcinomas e papilomatoses. Embora estas patologias sejam de natureza celular, eram anteriormente estudadas apenas com base na observação macroscópica, somente complementada por uma informação histológica decorrente de uma eventual biópsia. Esta informação de carácter microscópico é, no entanto, posterior à observação clínica e limitada unicamente à área biopsada [3,5].

Participámos nesta experiência da adaptação da técnica para os territórios da Otorrinolaringologia desde o início. Tivemos o privilégio de fazer parte integrante desta equipa chefiada pelo Professor Mário Andrea, vivenciando as dificuldades e os desafios inerentes aos seus primeiros passos. Assistimos às primeiras observações da mucosa laríngea, ainda com o colpocistoscópio. Tivemos oportunidade de colaborar nos muitos estudos que se seguiram sobre a endoscopia de contacto e a sua aplicação, inicialmente na laringe e posteriormente em diferentes territórios do tracto aerodigestivo [3], nomeadamente na mucosa nasal [4], orofaringe, rinofaringe e boca. Estes estudos foram apresentados em várias reuniões onde conquistaram alguns prémios científicos. A endoscopia de contacto foi tema de um curso da Academia Americana de Otorrinolaringologia apresentado pelo Professor Mário Andrea durante vários anos, sempre com altas classificações.

Três destes estudos foram publicados em revistas de alto índice de indexação: um na *Annals of Otology, rhinology & Laryngology* de ST. Louis U.S.A. [3] e dois na *acta*

sueca, Acta Oto-Laryngologica (Stockholm) [4,5]. Estes três artigos foram citados em mais de trinta publicações científicas indexadas e em alguns livros de texto de Otorrinolaringologia. Um destes estudos foi galardoado com um prémio científico da Sociedade Portuguesa de Ciência (2º prémio Pfizer).

Os resultados encorajadores destes trabalhos preliminares, associados ao facto de ser uma técnica não invasiva e de rápida execução, levou a que a endoscopia de contacto passasse a fazer parte integrante do protocolo de observação da laringe durante a realização de microlaringoscopias, no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Santa Maria em Lisboa. Este protocolo começou por incluir a utilização sistemática de quatro endoscópios de angulação diferente 0º, 30º, 70º e 120º que garantiam uma completa observação macroscópica da laringe e de todas as lesões aí localizadas [3]. Após estar garantida a observação macroscópica minuciosa e completa, a única forma de progredir na avaliação das lesões durante a microlaringoscopia seria ultrapassar a barreira do macroscópico e conseguir informação microscópica sobre as lesões. Com a endoscopia de contacto a observação é rápida, não lesa os tecidos e permite uma avaliação microscópica de células e microvasos que nos pode oferecer informações complementares à observação macroscópica. Possibilita detectar lesões, identificar a sua natureza histológica, delimitar essas lesões de forma mais rigorosa, controlar a sua exérese cirúrgica garantido uma margem de segurança com maior eficácia e, ainda, participar no seguimento pós terapêutica, aumentando a eficácia do tratamento sem aumentar a morbilidade [3,5].

## **TERRITÓRIOS DE APLICAÇÃO DA TÉCNICA**

Após os primeiros resultados positivos, a empresa de endoscópios Karl Storz sob a orientação do Professor Mário Andrea e do Professor Óscar Dias, produziu um protótipo de um endoscópio de contacto desenhado especialmente para a laringe que depois de testado com êxito, deu origem a um conjunto de endoscópios comercializados. A disponibilidade instrumental permitiu que comesçassem a ser realizados vários trabalhos por outras equipas internacionais, muitos deles apresentados em reuniões internacionais e publicados em revistas científicas.

De entre os vários trabalhos publicados sobre a aplicação da endoscopia de contacto ao estudo da patologia da laringe e ao estudo da sua especificidade e sensibilidade comparando com a Anatomia Patológica, destacamos alguns.

## MUCOSA DA LARINGE

A mucosa da laringe foi o primeiro território estudado por endoscopia de contacto. O primeiro artigo foi publicado no *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* de St Louis U.S.A.. Tratou-se de um estudo realizado pelo Professor Mário Andrea, pelo Professor Óscar Dias e por mim em que, com base na avaliação de 68 doentes, foi apresentada a endoscopia de contacto, com os respectivos procedimentos e critérios de diagnóstico bem como, os principais padrões patológicos. Entre os quais se destacam: os tumores malignos, o papiloma e as laringites crónicas com inflamação crónica ou com hiperqueratose [3]. Foram discutidas as aplicações da técnica, as suas vantagens e as suas limitações.

Posteriormente, foi publicado na *Acta Otolaryngol* de Estocolmo [4] um segundo estudo em que foram estudados 92 doentes, tendo sido apresentados os padrões celulares e vasculares de diagnóstico de várias patologias bem como a descrição do padrão normal, baseado num estudo comparativo com técnicas de microscopia óptica e de microscopia electrónica de transmissão e de microscopia electrónica de varrimento. Após esta duas publicações surgiram vários outros estudos sobre o mesmo território, publicados em revistas científicas de vários países, dos quais destacamos os que se seguem.

Um dos primeiros estudos que envolveu uma população de 18 doentes com patologia da mucosa laríngea submetidos a cirurgia, foi realizado por uma equipa chefiada por Elena Carriero [6] que concluiu existir uma boa correlação do diagnóstico da endoscopia de contacto com o diagnóstico histopatológico. Concluíram que a endoscopia de contacto poderia substituir o exame anatomopatológico em alguns casos. A maior limitação citada neste trabalho era o facto de defenderem que a técnica exigia a colaboração e a disponibilidade do anatomopatologista [6]. Estamos, no entanto, perante um objectivo completamente diferente do nosso que defende a endoscopia de contacto como uma técnica capaz de complementar a informação clínica em tempo real e de ser usada por um clínico sem dependência directa do anatomopatologista, para o diagnóstico de malignidade.

Uma equipa de Split, da Croácia, chefiada por Cikojevic comparou o diagnóstico de endoscopia de contacto durante a cirurgia de tumores da laringe com o exame anátomo-patológico extemporâneo [7]. O estudo teve uma população de 142 doentes com lesões da mucosa laríngea classificadas em 3 tipos: 70 lesões benignas, 23 lesões potencialmente malignas e 49 lesões malignas. Concluíram que, na população estudada, a endoscopia de contacto mostrou-se mais eficaz do que o exame extemporâneo para identificar malignidade quando comparado com o exame de anatomia patológica da



peça e da biópsia realizada durante a cirurgia. Defenderam também a capacidade da endoscopia de contacto para avaliar as margens das lesões de uma forma mais exacta e sem a agressão tecidual da biópsia [7].

Uma equipa alemã, chefiada por Christoph Arens, associou a endoscopia de contacto à imunofluorescência e chamou-lhe compact endoscopy. Estudaram 83 doentes com patologia potencialmente maligna ou maligna da mucosa da laringe [8] que submeteram a microlaringoscopia, onde aplicaram a técnica compact endoscopy que, resulta da combinação da endoscopia de contacto com autofluorescência. A endoscopia de contacto é realizada durante o processo de autofluorescência reforçando assim a capacidade de detecção precoce de lesões malignas. Os autores defendem conseguir identificar os carcinomas e avaliar o grau de invasão tumoral, detectando a eventual existência de permeação da membrana basal. Concluíram ser possível o diagnóstico diferencial entre carcinomas in situ e carcinomas microinvasivos [8]. Os investigadores assinalam ainda a importância da técnica para melhorar a delimitação tumoral determinando in situ os seus limites microscópicos. O estudo teve como teste padrão o diagnóstico de anatomia-patológica das biópsias e das peças cirúrgicas [8].

Alguns autores utilizaram a endoscopia de contacto para estudar, especificamente, a microcirculação da mucosa laríngea [9]. Destacamos os trabalhos de Jeferson D'Avila que realizou o estudo da sua tese de Doutoramento sobre alterações vasculares nas lesões benignas da laringe, estudadas por endoscopia de contacto [10]. Este investigador brasileiro estudou e descreveu as alterações vasculares dos quistos e lesões traumáticas da corda vocal contralateral com base em observações realizadas com endoscópios rígidos e endoscopia de contacto [10].

As alterações vasculares são importantes na generalidade das doenças da laringe mas assumem maior importância clínica nos tumores malignos, devido aos fenómenos de angioneogénese que os caracterizam. Sone M et al estudaram e defenderam a capacidade da endoscopia de contacto e do laser doppler flowmetry para um melhor conhecimento morfológico e fisiopatológico destas doenças bem como para o seu diagnóstico e seguimento numa população de 24 doentes [9].

A aplicação da endoscopia de contacto na laringe não se limitou ao diagnóstico e seguimento mas também à terapêutica, como demonstra um estudo publicado por Dedivitis *et al* [11]. Numa população de 10 doentes com tumores glóticos submetidos a laringectomia fronto-lateral, foi testada a capacidade da endoscopia de contacto em determinar com exactidão as margens microscópicas do tumor. Estas margens foram

confirmadas posteriormente nas peças cirúrgicas com exame anátomo-patológico, tendo existido uma concordância de 100% entre a determinação das margens por endoscopia de contacto durante a cirurgia e as margens da lesão excisada, posteriormente confirmadas por histologia. Este estudo, apesar de apresentar uma população reduzida, demonstra a importância da técnica na determinação das margens microscópicas das lesões que nem sempre coincidem com as margens macroscópicas, referência clássica para a delimitação da doença durante a cirurgia e consequente margem cirúrgica de segurança. No seguimento destes doentes não ocorreu nenhuma recidiva tumoral.

## MUCOSA DA NASOFARINGE

A nasofaringe foi outro território também bastante estudado, justificado pelo facto de Portugal possuir uma alta incidência de tumores malignos com esta localização. A nasofaringe foi provavelmente a região em que a aplicação clínica do endoscópio de contacto foi mais rápida a nível internacional, nomeadamente no extremo Oriente, em Singapura e na China. Nestes países foram publicados alguns trabalhos sobre a capacidade da endoscopia de contacto para o rastreio e diagnóstico do carcinoma da nasofaringe que apresentam a sua maior incidência a nível mundial nesta área do globo.

Destacamos dois trabalhos publicados. O primeiro com origem num serviço de Otorrinolaringologia chinês chefiado por Huang Xiaoming [12] e outro de um serviço de Otorrinolaringologia de Hong Kong, chefiado por Wai Pak [13].

Huang Xiaoming e a sua equipa estudaram uma população de 80 doentes com patologia da rinofaringe, constituída por 57 casos de carcinoma e 23 casos de lesões sem malignidade. Compararam os diagnósticos de endoscopia de contacto com os resultados do exame histológico e concluíram que a endoscopia de contacto é uma técnica fiável para diagnosticar lesões malignas na consulta. Para além do rastreio e da detecção precoce do carcinoma da nasofaringe, a técnica revelou-se útil para definir as margens das lesões e ajudar na detecção precoce de recidivas durante o seguimento. Como limitação, foi registado apenas o facto do endoscópio ser rígido poder condicionar a observação de algumas áreas da rinofaringe, dependendo da anatomia do doente, da sua colaboração e da localização da lesão.

Martin Wai Pak e a sua equipa fizeram dois estudos [13,14] um para avaliar a capacidade de diagnóstico de carcinomas da rinofaringe por endoscopia de contacto, com resultados semelhantes aos anteriormente publicados, realizaram ainda um estudo prospectivo com

uma população de 64 doentes com história de carcinoma da nasofaringe submetidos a radioterapia. A endoscopia de contacto foi realizada, na consulta de seguimento, sob anestesia local. Foi atribuído a 58 doentes um diagnóstico que se classificou em 3 tipos: lesões malignas por persistência ou recorrência do tumor (n=5), metaplasia epitelial (n=43) e atipias pós irradiação (n=10). Os autores apresentaram como resultados uma especificidade e uma sensibilidade de 100% para o diagnóstico por endoscopia de contacto na detecção de lesões malignas recorrentes ou persistentes, tendo como teste padrão o exame histológico. A conclusão revela que a endoscopia de contacto é uma técnica segura para complementar a observação clínica na consulta, com o objectivo de melhorar a eficácia do seguimento no carcinoma da nasofaringe.

## MUCOSA NASAL

A mucosa nasal foi um dos primeiros territórios estudados com endoscopia de contacto. A aplicação da técnica teve como objectivo a avaliação das situações de rinite crónica, como ficou documentado no artigo que publicámos como co-autores na *Acta Otolaryngologica* (Stockh) [4]. Este estudo foi realizado numa população com 50 doentes. A mucosa nasal foi observada sem anestesia ou com anestesia local (xilocaína® – spray). Os factores ou variáveis estudados foram, para além dos aspectos celulares do epitélio nasal, os infiltrados inflamatórios, as alterações da microvascularização, as características do muco, os ostia glandulares e ainda as alterações a nível ciliar. Os achados celulares avaliados para diagnosticar a inflamação crónica e distinguir diferentes tipos de rinite são distintos dos considerados para a detecção de malignidade. Consideramos como factores ou achados celulares mais importantes a relação núcleo/citoplasma aumentada, com núcleos de grandes dimensões mas sem alteração da forma, a regularidade linear dos limites nucleares, os aspectos de metaplasia epitelial com alterações dos cílios e a identificação de infiltrados inflamatórios de diferentes tipos. O estudo dos infiltrados inflamatórios foi realizado durante a consulta de forma isolada ou englobado na realização de testes de provocação imunológica [4].

Um dos nossos trabalhos sobre a avaliação de rinites crónicas por endoscopia de contacto, "Contact endoscopy in persistent chronic rhinitis", foi galardoado com um prémio no congresso europeu de imunoalergologia que decorreu em 2008 em Barcelona.

A endoscopia de contacto foi usada para estudar doenças específicas do nariz como o papiloma Schneideriano e os polipos inflamatórios [15]. Fabrizio Romano *et al* estudaram, numa população de 19 indivíduos, a importância da técnica no diagnóstico

destas entidades nosológicas. Considerando que a taxa de recidiva destas patologias é elevada e obriga a um seguimento longo, é importante existir uma técnica não invasiva que possa ser utilizada na consulta, para complementar a informação e observação clínica macroscópica. Os autores conseguiram demonstrar uma concordância de 81% com a Anatomia Patológica e acreditam que a endoscopia de contacto pode ajudar no diagnóstico e *follow up* no papiloma e na polipose nasal [15].

No âmbito da avaliação vascular pela endoscopia de contacto, referenciamos um trabalho de Folz e Werner [16] que estudaram, em 27 doentes, a aplicação da endoscopia de contacto no síndrome de Rendu-Osler-Weber. Os autores descreveram algumas alterações na morfologia dos capilares da mucosa nasal destes doentes e concluíram que a técnica tem boas potencialidades para o diagnóstico precoce, orientação terapêutica e seguimento dos doentes portadores desta patologia [16].

## MUCOSA DO ESÓFAGO – ESTÔMAGO – CÓLON

O esófago tem igualmente sido estudado por endoscopia de contacto. No início da aplicação da técnica na mucosa deste órgão, até 2003, eram utilizados endoscópios de contacto rígidos que não permitiam ultrapassar alguns problemas técnicos no acesso ao padrão celular e vascular. Embora fosse possível observar células e vasos, e até diagnosticar lesões tumorais, a percentagem de sucesso era baixa e inconstante [17].

Após a empresa de endoscópios Olympus, em 2003, ter produzido um endoscópio de contacto flexível, os progressos foram evidentes e, inicialmente, alguns estudos descrevem algumas dificuldades técnicas em obter imagens de qualidade da mucosa esofágica [17].

Fujishiro *et al* realizaram um estudo com 27 doentes com carcinoma pavimento celular do esófago, tendo por objectivo avaliar a possibilidade da endoscopia de contacto poder substituir a biópsia e o exame anátomo-patológico no diagnóstico e na orientação terapêutica. Apesar de considerarem uma técnica promissora neste campo, a dificuldade técnica em obter imagens numa percentagem elevada de doentes limitaria a aplicação da endoscopia de contacto na clínica. Assinalaram ainda ser necessário investir no estudo com vista a diferenciar os vários tipos de displasias e também na diferenciação de tumores *in situ* para invasivos ou microinvasivos [18].

Haruhiro Inoue *et al* estudaram a mucosa esofágica, a mucosa do estômago e a mucosa do cólon [19] tendo conseguido obter imagens de boa qualidade na quase totalidade

dos indivíduos, numa taxa superior a 95%, considerando uma técnica com potencial para o desenvolvimento futuro.

Cerca de dois anos depois, Kumagai e a sua equipa, ao observarem o padrão celular e microvascular em praticamente todos os doentes, demonstravam estar ultrapassada a limitação técnica de obter imagens com boa definição no esófago. Concluíram ser possível descrever diferentes padrões celulares e vasculares superficiais que podem diagnosticar diferentes níveis de displasia e realizar o diagnóstico diferencial entre carcinoma in situ e carcinoma microinvasivo ou invasivo [20]. A detecção do carácter invasivo tumoral baseava-se prioritariamente em alterações da arquitectura vascular e da sua cinética circulatória [20].

Em 2010 Kumagai e a sua equipa, que incluía um anatomopatologista, apresentou um estudo com um novo endoscópio (Gif - Y 0002), onde se concluía, com base num estudo em 11 doentes com carcinoma pavimento celular do esófago, que poderiam abdicar da biópsia e do respectivo diagnóstico anatomopatológico em 82% dos casos [21].

A mucosa do estômago tem igualmente sido estudada através da observação com endoscópios de contacto flexíveis [19]. No entanto, a mucosa gástrica revela-se mais difícil de ser corada e observada, em parte devido à sua histologia e também ao muco que impede o corante e a lente do endoscópio de tocar as células [20]. Nos casos em que é possível obter imagem de qualidade é detectável a malignidade, embora sem distinção do tipo histológico do tumor [20].

O cólon tem sido um dos órgãos onde se tem testado a aplicação da endoscopia de contacto através da utilização de endoscópios de contacto flexíveis [22]. Sasajima e a sua equipa estudaram uma população de 113 doentes, com lesões benignas e malignas desta mucosa. Concluíram que a endoscopia de contacto permitia realizar o diagnóstico diferencial entre malignidade e benignidade, com uma concordância de 93,3% em relação à anatomia-patológica. Os resultados destes autores demonstram existir capacidade da endoscopia de contacto para estabelecer o diagnóstico diferencial entre polipos hiperplásicos histologicamente benignos e situações de displasia de baixo grau ou displasias graves. Este diagnóstico é baseado na observação de alterações celulares individuais, como a alteração da forma nuclear, e gerais, onde se destaca a alteração da normal estrutura tecidual [22]. Descreveram algumas vantagens em relação à biópsia das quais se destacam o resultado imediato, a localização precisa da lesão e o facto de o diagnóstico poder ser realizado mesmo em situações que contra indicam a biópsia, como nos problemas de coagulação. As limitações estão relacionadas com excesso

de muco ou existência de pequenas hemorragias da mucosa que podem dificultar a observação por endoscopia de contacto [22].

## CABEÇA E PESCOÇO E CAVIDADE ABDOMINAL

Ainda no domínio da cabeça e pescoço, e fora do âmbito das mucosas, a endoscopia de contacto foi testada por Dendivitis et al para a identificação intra-operatória das glândulas paratiróides durante 5 tiroidectomias totais e 5 hemi-tiroidectomias [23]. Alguns estudos referem que, em cerca de 11% das tiroidectomias realizadas por cirurgiões experientes, as paratiróides são excisadas acidentalmente. A variação na localização e no número destas glândulas associada à sua pequena dimensão, 6-8 mm, faz com que, mesmo cirurgiões experimentados, possam não as localizar ou confundir com tecido adiposo, tecido tiroideu, gânglios linfáticos ou outras estruturas. Os autores do estudo concluíram que a endoscopia de contacto é um método auxiliar eficaz para a detecção intra-operatória destas glândulas durante a realização de tiroidectomia [23].

A endoscopia de contacto foi também testada fora do território da cabeça e pescoço em áreas não mucosas. Eguchi H. et al [24] avaliaram a capacidade da técnica para detectar células neoplásicas malignas na área peri pancreática durante cirurgias por adenocarcinoma do pâncreas. A terapêutica mais eficaz para estes tumores consiste na exérese cirúrgica mas as recorrências são frequentes. A infiltração dos tecidos conjuntivos adjacentes por células neoplásicas malignas é considerada uma das maiores causas desta recorrência. Em muitos casos, esta infiltração ocorre na parede da veia mesentérica portal superior. Para a sua detecção durante a cirurgia, pode realizar-se um exame extemporâneo que implica uma biopsia que danifica a parede do vaso e obriga à sua reconstrução posterior. Como alternativa menos invasiva, pode realizar-se uma citologia esfoliativa. Neste estudo, com 11 doentes, realizou-se como técnica não invasiva alternativa, não a habitual citologia esfoliativa mas a observação por endoscopia de contacto. Os autores concluíram tratar-se de uma boa alternativa por registarem uma eficácia diagnóstica semelhante à histologia para a detecção de malignidade e conseguirem evitar a biópsia e a consequente danificação do vaso. As vantagens apresentadas em relação à citologia esfoliativa, que também não é invasiva, basearam-se no facto do resultado da endoscopia de contacto ser imediato, logo mais rápido que o diagnóstico citológico e, também, mais preciso, pois a endoscopia de contacto indica a localização exacta da colonização por células atípicas [24].

## MUCOSA ORAL

Apesar de a boca ser o órgão anatomicamente de mais fácil acesso para a endoscopia de contacto, foi o último a ser observado de forma regular pela equipa que integrámos. Fizemos estudos preliminares sobre a aplicação da endoscopia de contacto na mucosa oral em 2007, com uma população de 30 doentes com lesões malignas e potencialmente malignas. Embora com a limitação inerente ao facto de a população ser relativamente pequena, os resultados demonstraram uma boa especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de malignidade, com valores superiores a 90%, tendo como teste padrão o diagnóstico anatomopatológico. Estes estudos proporcionaram-nos, em 2007, dois prémios no Congresso Europeu de Otorrinolaringologia realizado em Viena: “Best poster in Oncology” e 3º prémio dos trabalhos apresentados na área “Head and Neck”.

Desde a execução destes estudos, foram publicados cinco trabalhos sobre a aplicação da endoscopia de contacto neste território. Um deles foi no mesmo ano, em 2007, e os outros mais recentes. Todos eles tiveram como objectivo avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica, tendo como teste padrão o exame anatomopatológico.

Pelucchi et al em 2007 realizaram um estudo com 20 adultos, 10 indivíduos saudáveis e 10 casos de doenças inflamatórias da cavidade oral. Concluíram que a técnica é fácil de realizar, não tem efeitos secundários indesejados e permite observar a morfologia celular e a rede superficial vascular [25]. Em 2011, Saeki N. *et al*, numa amostra de 66 doentes com doenças orais e da língua, compararam o diagnóstico da endoscopia de contacto com o exame anatomopatológico e obtiveram uma sensibilidade de 91,3% (42/46 doentes) e uma especificidade de 100% (20/20 doentes) [26]. Em 2014 surgiram dois novos estudos: O primeiro de Dowthwaite S. *et al*, com 34 doentes comparando o diagnóstico da endoscopia de contacto com o exame anatomopatológico tendo obtido uma sensibilidade e especificidade de 89% e 100% respectivamente [27]; o segundo estudo realizado na Índia com uma amostragem de 74 doentes com lesões na mucosa oral com indicação para biópsia, apresentou uma sensibilidade de 84,21% e uma especificidade de 94,44% para o diagnóstico realizado por endoscopia de contacto [28]. Filippo Carta *et al* realizaram um estudo baseado apenas na observação do padrão vascular para diagnosticar lesões pré tumorais e tumorais da boca e orofaringe utilizando a endoscopia de contacto associada a um sistema de image-enhanced-endoscopy que denominaram enhanced contact endoscopy. Os autores concluíram poder realizar o diagnóstico diferencial entre lesões hiperplásicas, displásicas e carcinoma [29].



Os resultados destes trabalhos são concordantes, mostrando uma sensibilidade e especificidade elevadas na comparação da capacidade de detecção de malignidade pela endoscopia de contacto quando comparada com a da Anatomia Patológica.

## OBJECTIVOS

No presente trabalho pretendemos avaliar, na nossa população, a capacidade da técnica para detectar malignidade na mucosa da boca, tendo como teste padrão o diagnóstico de Anatomia Patológica. No entanto, possuímos objectivos mais abrangentes que possam posicionar a endoscopia de contacto como uma técnica válida no âmbito teórico, e com possibilidade de aplicação por clínicos na prática diária, de forma a colmatar algumas lacunas ao nível do diagnóstico e do seguimento das lesões potencialmente malignas e do cancro da mucosa oral.

A necessidade de evoluir no sentido de encontrar uma técnica, que permita diagnosticar e monitorizar lesões potencialmente malignas e malignas da mucosa oral é defendida desde há bastante tempo, na literatura [30,31,32,33] e em congressos internacionais. Referimos como exemplo o Congresso da Academia Americana de Cabeça e Pescoço, realizado em Nova York em 2015, onde a palestra sobre carcinoma da boca terminou com a última frase das conclusões a ressaltar a necessidade de existir uma técnica não invasiva para detectar e monitorizar doentes com lesões suspeitas da mucosa oral.

Julgamos que a nossa experiência no estudo das mucosas aerodigestivas por endoscopia de contacto, ao longo de mais de vinte anos, nos coloca numa posição privilegiada para realizar o presente trabalho, testando a aplicação da endoscopia de contacto no diagnóstico de lesões malignas na mucosa oral. Avaliaremos, com base nos resultados quantitativos e qualitativos, qual o possível contributo da endoscopia de contacto para o diagnóstico do cancro da mucosa oral.

Este estudo pretende esclarecer algumas questões cruciais, contribuindo para aumentar os níveis de credibilidade da técnica. A simplificação de alguns aspectos inerentes à estratégia diagnóstica poderá proporcionar aos clínicos uma aprendizagem rápida e segura e, assim, garantir uma maior adesão à técnica, traduzida por maiores índices de aplicação prática. Esta difusão ajudará ao aparecimento de mais equipas de investigação que contribuirão para a evolução da endoscopia de contacto.



Tentaremos, com esta investigação, resolver alguns problemas e contribuir para o aparecimento de outros que abrirão as portas para mais estudos, mais discussão científica e, logo, mais progresso.

## OBJECTIVO GERAL

O objectivo principal do nosso estudo baseia-se na resposta à seguinte questão:

**Poderá a endoscopia de contacto, utilizada por clínicos, assumir-se como um instrumento complementar de diagnóstico à observação clínica e à anatomia patológica, para o diagnóstico de tumores malignos da mucosa oral?**

## OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

**I - Avaliar a capacidade da endoscopia de contacto para discriminar lesões não-malignas e lesões malignas em tempo real.**

Estimar a sensibilidade e a especificidade do teste de diagnóstico por endoscopia de contacto, na distinção entre lesões orais malignas e não malignas. Considerou-se como teste padrão o diagnóstico realizado por exame anatomopatológico.

Avaliar igualmente a concordância, entre:

- Diagnóstico de endoscopia de contacto e diagnóstico de Anatomia Patológica
- Diagnóstico de endoscopia de contacto e diagnóstico clínico

**II - Avaliar a importância relativa das várias características ou achados celulares e vasculares no diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.**

Esta noção permitirá uma melhor reprodução da técnica por todos os clínicos interessados, bem como uma melhor comparação e avaliação de resultados entre diferentes equipas, mesmo com graus de experiência muito diferentes.

**III - Determinar quais os critérios de diagnóstico mais simples na avaliação por endoscopia de contacto para fazer o diagnóstico de malignidade com segurança.**

Consideramos este objectivo importante porque quanto mais simples for a decisão, menor é a curva de aprendizagem da técnica para estabelecer o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto, e consequentemente, maior será a confiança do clínico para utilizar a técnica.

Para isso procurar-se-á identificar quais as características celulares e vasculares mais importantes para estabelecer o diagnóstico de malignidade. E, dessas características, quais as que são essenciais e suficientes para garantir um diagnóstico com boa capacidade preditiva.

Com a concretização deste objectivo tentámos dar resposta à crítica mais comum em todas as apresentações da técnica que fizemos até hoje. O facto da maioria dos clínicos não ter formação histológica pós-licenciatura poder dificultar a compreensão das imagens obtidas por endoscopia de contacto, condicionado a validade do diagnóstico e a segurança do resultado.

A simplificação da estratégia e da execução do diagnóstico de malignidade pode contribuir para uma curva de aprendizagem rápida e uma maior autoconfiança na fiabilidade do resultado.

#### **IV - Avaliar a capacidade de clínicos sem formação ou experiência prévia com a técnica, para diagnosticar a existência de malignidade na mucosa oral através da observação por endoscopia de contacto.**

Embora tenha sido considerada uma população limitada, as conclusões permitem ter uma noção preliminar do grau de dificuldade de interpretação dos resultados da endoscopia de contacto para quem não tem experiência com a técnica e ajudará a programar futuras acções para a formação de clínicos que queiram utilizar este procedimento.

#### **V - Estudar os efeitos secundários e morbilidade da técnica.**

Apesar de todas as referências da literatura estarem de acordo sobre a ausência de efeitos secundários associados, julgamos que devemos deixar registado os nossos resultados pois, como procedimento considerado não invasivo, é importante a concordância absoluta de todos os grupos com experiência em diferentes órgãos.

# MUCOSA ORAL NORMAL

A mucosa da boca é formada por epitélio e por tecido conjuntivo denominado lâmina própria ou córion. A mucosa oral reveste a cavidade bucal e está integrada na mucosa aerodigestiva. Possui várias funções, entre as quais se destacam a protecção mecânica, a impermeabilização, a defesa contra microorganismos patogénicos, as funções sensoriais e a função secretora. A protecção mecânica e a impermeabilização garantem a integridade da mucosa da boca, naturalmente exposta a intenso atrito e traumatismos frequentes. A mucosa constitui também uma defesa física e imunológica contra os microorganismos que possam existir na boca. Os abundantes receptores gustativos, tácteis e térmicos conferem-lhe propriedades sensoriais específicas e importantes. A função secretora é extraordinariamente relevante, pois garante a manutenção de uma película de saliva que possui propriedades químicas, antimicrobianas, enzimáticas, mecânicas e hidratantes essenciais. Podemos ainda referir a função de regulação térmica, embora no Homem esta seja uma qualidade residual [34].

## EMBRIOLOGIA

O epitélio da boca deriva da ectoderme, enquanto que a lâmina própria é um derivado do ectomesênquima [35].

Na terceira semana de vida embrionária conseguimos já identificar, na cavidade oral primitiva, um epitélio delgado e um ectomesênquima subjacente. Este epitélio é constituído por células cúbicas distribuídas por duas camadas distintas: uma mais basal com células mais altas e outra mais superficial, constituída por células mais achatadas [36].

Durante a quarta semana, o ectomesênquima começa a receber a migração de células das cristas neurais e durante a sétima semana, o epitélio deixa de ser semelhante em todas as regiões da boca, começando já a identificar-se dois tipos de tecidos: o epitélio situado para fora do sulco vestibular, que vai dar origem à mucosa jugal e à mucosa dos lábios e o epitélio localizado para dentro do sulco vestibular que vai diferenciar-se na mucosa das gengivas, do palato, do pavimento da boca e da face ventral da língua.

Entre a nona e a décima primeira semana de vida embrionária, o epitélio do dorso da língua começa a dar origem aos diferentes tipos de papilas [36].

Após a décima quarta semana, o epitélio torna-se bastante estratificado, estando a fase de proliferação completamente implementada [36].

Nas semanas seguintes, segue-se a fase de maturação e a partir da vigésima semana o epitélio adquire características já muito próximas das definitivas [36].

O epitélio da mucosa oral, após os 6 meses de idade, adquire uma morfologia e uma estrutura que se podem considerar muito próximas do definitivo [36].

## **MORFOLOGIA**

O epitélio da cavidade oral é do tipo pavimentoso estratificado, podendo ser ou não queratinizado, consoante a sua localização [36]

A lâmina própria ou córion, constituída por tecido conjuntivo do tipo laxo que se encontra subjacente ao epitélio, é essencial para a mucosa, possuindo várias funções das quais se destacam a sustentação estrutural, a nutrição e a defesa [34].

Entre o epitélio e a lâmina própria, encontra-se a lâmina basal. Esta estrutura é muito importante na fisiologia da mucosa, mas também na fisiopatologia de algumas doenças, nomeadamente, como primeira barreira à extensão das neoplasias malignas epiteliais. A mucosa pode ser comparada no seu arranjo estrutural à pele, correspondendo o epitélio à epiderme e a lâmina própria à derme. No entanto, ao contrário da pele, a mucosa não possui estruturas anexas, sendo atravessada em algumas regiões, por ductos de glândulas salivares, que terminam apicalmente na superfície do epitélio [37].

A lâmina própria está apoiada numa submucosa de tecido conjuntivo onde se encontram frequentemente tecido adiposo e glândulas salivares minor. A submucosa, que corresponde à hipoderme da pele, está ausente em alguns territórios da boca. [34].

## EPITÉLIO DA MUCOSA ORAL

Os epitélios são um tecido constituído por um conjunto de células muito coesas, denominadas na sua maioria queratinócitos, que revestem as superfícies internas e externas do corpo, entendendo-se o termo superfície em sentido lato, pois reveste também pequenas cavidades e ductos ou canalículos. Para além dos epitélios de revestimento, descrevem-se também os epitélios glandulares [38]. O tecido epitelial caracteriza-se por uma grande densidade celular com pouca matriz intercelular, e é tipicamente avascular, sendo a sua nutrição e oxigenação realizada por difusão de metabolitos e oxigénio desde a lâmina basal [36].

Os epitélios classificam-se com base no número de camadas celulares observadas em microscopia óptica em: epitélios simples, estratificados e pseudo-estratificados [39].

Os epitélios simples são constituídos apenas por uma camada de células e subdividem-se em: pavimentosos, cúbicos e cilíndricos em função da forma, altura e largura das suas células [38].

O epitélio estratificado é constituído por duas ou mais camadas de células e divide-se em subtipos com base na forma das suas células mais apicais [38]. Os epitélios estratificados têm uma função de revestimento e defesa física, química e microbiológica, mas têm também uma função sensorial, de secreção, de absorção e outras ainda mais específicas, conforme os órgãos em causa [37]. No caso dos epitélios estratificados, como o da mucosa oral, a função de absorção e secreção é bastante residual. Estes tecidos são, maioritariamente, estruturas protectoras e existem em órgãos associados a grande stresse mecânico, como a boca. Esta protecção defende ainda a cavidade oral de variações significativas da temperatura e humidade e da grande quantidade de bactérias, algumas patogénicas, que normalmente se encontram no seu interior [37].

O epitélio da mucosa oral é do tipo estratificado pavimentoso. Caracteriza-se por possuir mais do que uma camada de células poliédricas. Esta forma celular tem alguma variação conforme as camadas epiteliais. Em geral, o aspecto poliédrico é obtido pelo facto das células estarem compactadas como se fossem balões comprimidos entre si num espaço limitado [40]. As células das camadas mais superficiais assumem uma disposição em que o eixo maior é paralelo à superfície, o que confere à face epitelial apical o aspecto de um pavimento de mosaicos [40].

## CAMADAS CELULARES

### CAMADA GERMINATIVA OU BASAL

A camada mais basal, ou mais profunda, é constituída pela camada germinativa onde as células se multiplicam por mitose, sendo aqui que se encontram as mais indiferenciadas. Estas células apresentam uma forma mais cúbica ou prismática, são imaturas, e caracterizam-se por possuírem núcleos grandes e pouco citoplasma. Apresentam uma grande relação núcleo-citoplasma, semelhante em todas as células da mesma camada [41]. As células mais profundas ou mais basais, que contactam com a lâmina basal, desenvolvem uma especialização da membrana chamada hemidesmossoma que reforça a ligação do epitélio ao tecido conjuntivo. Esta especialização é uma variante dos desmossomas que reforçam a ligação entre os queratinócitos [41].

### CAMADA ESPINHOSA

Após a sua formação, as células começam a migrar no sentido basal-apical em direcção à superfície. Estas células vão adquirindo formas mais irregulares, e quando observadas em microscopia óptica, apresentam um aspecto espinhoso. Esta aparência deve-se à observação de saliências semelhantes a espinhos a rodear as células, que se denominam pontes intercelulares ou pontes de Schultz. Na verdade, são visíveis em microscopia óptica, devido a um artefacto da técnica histológica. A retracção das células desencadeada por fenómenos de fixação e de desidratação, durante a técnica de preparação histológica, leva à evidenciação de prolongamentos celulares entre células adjacentes, nos pontos em que a adesão se encontra reforçada pela presença de desmossomas. Os desmossomas, e outras especializações de adesão ou junção da membrana citoplasmática, são muito importantes para garantir uma boa coesão intercelular, garantindo a integridade do epitélio ao impedir as células de se afastarem e criarem áreas de rotura [42]. Estas especializações e esta camada são tanto mais importantes quanto maior for o stresse mecânico ou o efeito de abrasão a que a superfície do epitélio está sujeita, como é o caso da mucosa bucal, principalmente nas áreas mastigatórias (F). Estas especializações de membrana existem em todo o epitélio mas são mais abundantes no estrato espinhoso [34].

## CAMADA GRANULAR

A camada granular é pouco proeminente nos epitélios não queratinizados, sendo mais evidente nos queratinizados. As células atingem este estrato após migrarem naturalmente a partir da camada espinhosa, assumindo uma posição em que o seu eixo maior se torna paralelo à superfície. Os núcleos mantêm a forma ovalar mas vão diminuindo de tamanho [37], condicionando uma redução na relação núcleo-citoplasma. Começam a ocorrer fenómenos de atrofia e involução de alguns organitos celulares e aumenta a deposição citoplasmática de citoqueratina. Estas células possuem caracteristicamente, grânulos de querato-hialina que contém filagrina e acabam por ser exocitados para o espaço intercelular, onde o seu conteúdo, ao preencher os espaços, forma uma barreira impermeável junto à superfície epitelial [34].

## CAMADA CÓRNEA OU APICAL

A camada córnea é a mais apical e a sua superfície possuiu um aspecto semelhante a um pavimento de mosaicos. É constituída por células com núcleos de pequenas dimensões o que condiciona um baixo rácio núcleo/citoplasma. O citoplasma é constituído praticamente só por citoqueratina, devido à grande involução dos organitos citoplasmáticos. As especializações de junção da membrana sofrem, igualmente, uma atrofia marcada, permitindo que as células iniciem o processo de descamação, fenómeno que encerra o ciclo de diferenciação, garantindo a renovação celular do epitélio [42].

Esta renovação constante das células é importante para fazer face ao desgaste traumático natural que ocorre na boca, e que lesa um número elevado de células. Este desgaste poderia condicionar uma diminuição acentuada do número de camadas celulares, comprometendo assim a integridade da mucosa [42].

Os epitélios estratificados pavimentosos, que revestem as regiões com maior abrasão mecânica na cavidade oral, possuem um estrato córneo muito desenvolvido e são em geral, queratinizados. As células caracterizam-se por se encontrarem preenchidas por filamentos intermédios de citoqueratina, tornando-se autênticas escamas de queratina [42]. O grau de atrito e de traumatismos varia conforme a região da mucosa oral, condicionando a necessidade de queratinização como factor protector das camadas superficiais. Quando a queratinização é completa denomina-se ortoqueratinização; quando é incompleta e, por isso, é ainda possível identificar núcleos picnóticos nos

queratinócitos superficiais, designa-se paraqueratinização. Encontramos também regiões da mucosa oral menos expostas ao atrito, nas quais não existe queratinização do epitélio. Este epitélio não queratinizado é normalmente menos espesso e possui muitos desmossomas, sendo difícil distinguir a camada granular da camada espinhosa [34].

## TIPOS CELULARES

O epitélio, para além das células típicas de revestimento, denominadas queratinócitos, é constituído por mais 3 tipos de células residentes: as células de Merkel, as células de Langerhans e os melanócitos.

As células migrantes são representadas pelas células inflamatórias. Estes elementos celulares têm origem no conjuntivo da lâmina própria, e atingem o epitélio após atravessarem a membrana basal. A sua detecção como células inflamatórias pode ser realizada em preparações histológicas para microscopia óptica, mas a sua identificação diferencial faz-se com marcadores específicos de imunocitoquímica, com colorações específicas, ou através de técnicas de microscopia electrónica.

## CÉLULAS DE MERKEL

As células de Merkel encontram-se na camada basal do epitélio por vezes adjacentes a terminações nervosas amielínicas e apresentam duas características típicas dos queratinócitos: possuem citoqueratina no citoplasma e desmossomas na membrana citoplasmática. Estas células são caracterizadas pela observação no citoplasma de grânulos ou vesículas contendo aparentemente neurotransmissores [34]. A membrana citoplasmática apresenta prolongamentos de pequenas dimensões, denominados esporões, que contactam com os queratinócitos adjacentes. Estas estruturas têm, aparentemente, função de mecano-receptores celulares com capacidade para transdução de energia mecânica para eléctrica [34].

## CÉLULAS DE LANGHERANS

As células de Langerhans distinguem-se dos queratinócitos e das células de Merkel, por não possuírem citoqueratina no citoplasma e por não terem desmossomas na sua membrana citoplasmática. Têm caracteristicamente um aspecto dendrítico e



identificam-se no citoplasma os típicos grânulos em forma de bastão, chamados grânulos de Bierbeck. O núcleo é lobulado, pouco electrodense, claro e com heterocromatina periférica abundante. As células de Langerhans localizam-se no estrato espinhoso e são *APC cells (antigen presenting cells)*, células apresentadoras de antígenos [34].

## MELANÓCITOS

Os melanócitos derivam de precursores com origem nas cristas neurais que migram para a mucosa da boca e para a pele, durante a 11ª semana do desenvolvimento embrionário. Possuem uma forma dendrítica e localizam-se nas camadas basais, embora os seus dendritos se prolonguem entre os queratinócitos do estrato espinhoso. Estas células são ricas em retículo endoplasmático rugoso e em aparelho de Golgi, que participam na formação de grânulos de secreção citoplasmáticos contendo melanina. Estes grânulos, que se denominam melanossomas, após se formarem no aparelho de Golgi vão percorrer os dendritos, e acabam transferidos para os queratinócitos adjacentes. A função deste pigmento é bem conhecida na epiderme mas ainda desconhecida na mucosa oral [34].

## CÉLULAS NÃO RESIDENTES/CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

As células inflamatórias mais frequentemente observadas no epitélio oral são os linfócitos, os neutrófilos e os macrófagos. Estas células têm origem na corrente sanguínea e chegam ao epitélio via lâmina própria, após atravessarem a lâmina basal. Estas células são observadas mesmo em situações normais, em ausência de inflamação ou infecção. Podem encontrar-se em qualquer camada do epitélio estratificado pavimentoso [34].

## TECIDO CONJUNTIVO DA MUCOSA ORAL

### LÂMINA PRÓPRIA OU CÓRION

O tecido conjuntivo corresponde, nesta localização, à lamina própria e caracteriza-se por possuir poucas células e muita matriz intercelular. É um tecido bem vascularizado e innervado, constituído por células, fibrilhas e microfibrilhas.

A lâmina própria encontra-se subjacente ao epitélio e pode subdividir-se em duas camadas: a camada papilar e a camada reticular.

A camada papilar é a mais superficial sendo constituída por tecido conjuntivo laxo e organizada sob a forma de papilas conjuntivas que se interdigitam com o epitélio. Estas formações são essenciais para garantir uma boa nutrição do epitélio por fenómenos de difusão através da lâmina basal. Este arranjo estrutural, permite que o epitélio possa ter várias camadas de células, sem que isso reduza a nutrição dos elementos mais superficiais.

A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo mais denso, com mais fibras de tipo elástico e, principalmente, por fibras de colagénio. Estas estão dispostas em forma de rede, paralelas à superfície da mucosa [34].

As células mais comuns da lâmina própria da mucosa oral são os fibroblastos. Podem igualmente encontrar-se macrófagos, linfócitos e outras células, com origem na medula óssea [34].

Os fibroblastos são células fusiformes, produtoras de matriz extracelular e de fibrilhas e microfibrilhas. Possuem núcleo de forma oval pouco electrodense, sugerindo a existência de grande quantidade de eucromatina, onde se podem identificar normalmente dois a quatro nucléolos. Sendo células que sintetizam e excretam produtos que irão constituir a matriz extracelular, como a elastina e o colagénio, é natural que exista no seu citoplasma um retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi bastante desenvolvidos [34]. Ao envelhecer, estas células originam células pouco activas metabolicamente, denominadas fibrócitos, [34].

Os macrófagos são células fagocitárias com origem na medula óssea, onde se formam os monócitos que, posteriormente, se diferenciam nos macrófagos. Estas células são difíceis de identificar em preparações histológicas sendo necessário marcação citoquímica. Caracteristicamente, possuem grânulos citoplasmáticos de heparina e histamina e apresentam receptores de membrana para IgE [34].

Os linfócitos são leucócitos agranulares e caracterizam-se por serem células pequenas com pouco citoplasma visível, que atingem o tecido conjuntivo por fenómenos de diapedese [34].

## GLÂNDULAS SALIVARES MINOR DA MUCOSA ORAL

As glândulas salivares minor são do tipo exócrino, localizando-se na submucosa. Os seus canais excretores atravessam a mucosa e os seus *ostia* abrem-se na superfície epitelial libertando a sua secreção que constitui, no seu conjunto, a saliva.

## MORFOLOGIA

Estas formações glandulares encontram-se distribuídas por toda a mucosa oral e produzem secreção serosa e mucosa, pelo que são denominadas glândulas do tipo secretor misto [36]. O parênquima glandular é composto por unidades secretoras terminais de fundo cego e em forma de cacho de uvas, chamados ácinos. Cada uma destas unidades, origina um canal de pequenas dimensões, nomeado canal intercalar, que cresce e se anastomosa com outros ductos semelhantes, originando os canais estriados, que vão anastomosar-se entre si, originando os canais excretores que acabam por atingir a superfície epitelial [36].

### UNIDADES SECRETORAS TERMINAIS/ÁCINOS

A unidade secretora pode ser constituída apenas por células serosas, mucosas ou ser de natureza mista, assumindo um nome diferente consoante o tipo de elementos que a constituem. Ao redor das células secretoras encontram-se as células mioepiteliais [34].

Na mucosa bucal só existem glândulas serosas puras na língua, junto ao V lingual (glândulas de Ebner). Todas as outras são mistas, com excepção das encontradas no palato, onde embora predominantemente mistas, também se podem encontrar glândulas mucosas [34].

As células acinares serosas, especializadas em produzir uma secreção proteica, são piramidais apresentando o seu vértice virado para o lúmen da glândula. Possuem núcleo esférico e citoplasma muito basófilo. A ultraestrutura é típica de células produtoras de proteínas, com um retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi muito desenvolvido, associado a muitos grãos de secreção no citoplasma. Observam-se ainda bastantes mitocôndrias, sugerindo grande necessidade energética [34].

As células mucosas são as grandes produtoras de glicosaminoglicanos, produzindo, ao contrário das serosas, poucas enzimas. A sua morfologia está adaptada para a produção e armazenamento desta secreção, possuindo um núcleo de forma oval empurrado para a extremidade basal da célula, de forma a garantir a existência de espaço livre no citoplasma para o armazenamento dos glicosaminoglicanos. Esta ocupação quase total do citoplasma pela produção mucosa, é comprovada nas preparações com hematoxilina-eosina, onde o citoplasma não apresenta qualquer coloração e pela coloração com P.A.S. em que o citoplasma está quase totalmente corado de carmin.

A ultraestrutura revela uma quase ausência de retículo endoplasmático rugoso ou mitocôndrias. Em contraste, observa-se um grande desenvolvimento do aparelho de Golgi associado a uma intensa acumulação de grandes grãos de secreção que, ocupando a quase a totalidade do citoplasma, empurram o núcleo e os outros organitos para a porção basal da célula [34].

Os ácinos mistos são os mais frequentes nas glândulas salivares, sendo constituídos por ácinos mucosos aos quais está associada uma semilua de células serosas.

As células mioepiteliais ajudam a esvaziar as unidades secretoras e alguns ductos através de uma acção contráctil. As células mioepiteliais possuem prolongamentos que abraçam as unidades secretoras e assemelham-se a células musculares lisas com microfilamentos de actina e miosina no citoplasma. Estas células originam-se do epitélio bucal primitivo e, tal como os epitélios, possuem citoqueratina; na verdade, são células de origem epitelial mas com função muscular [36]. Existe em média uma célula mioepitelial por cada unidade secretora, embora algumas envolvam igualmente os ductos intercalares [34].

## SISTEMA CANALICULAR

O diâmetro dos canais vai aumentando desde as unidades secretoras até à superfície epitelial. Considera-se que esta rede de ductos tem, não só uma função de condução da secreção, mas também uma acção secretora, em que as células da parede dos canais realizam transporte transcelular entre o lúmen e o tecido conjuntivo no exterior dos ductos [36].

## CANAIS INTERCALARES

Os canais intercalares constituem o segmento do sistema canalicular que possui menores dimensões e está mais próximo dos ácinos, de onde recebem directamente a secreção. As suas paredes são constituídas por células cúbicas, com um núcleo central esferóide e citoplasma escasso. Estas células contribuem para alterar a secreção presente no lúmen dos ductos, através de transporte transcelular. No interior das suas células encontramos lisozima e lactoferrina, ambas enzimas com acção bactericida [36].

## CANAIS ESTRIADOS

Os canais estriados são originados pela confluência dos canais intercalares. O seu nome deriva das suas células possuírem um aspecto estriado, devido às invaginações da membrana basal. Esta especialização membranar, aumenta a superfície da membrana facilitando o transporte activo entre o citoplasma e o conjuntivo subjacente [36]. Entre as trocas que ocorrem neste processo, destacam-se a reabsorção de sódio por difusão simples do lúmen para o interior da célula e a excreção de potássio, por transporte activo para o lúmen, alterando assim a constituição da saliva. A secreção inicialmente produzida apresenta alta concentração de sódio e baixa concentração do potássio em relação ao plasma. A densa malha vascular, que envolve estes canais, facilita as trocas iónicas descritas [36].

As células das suas paredes são prismáticas com núcleo central e citoplasma acidófilo. O citoplasma exhibe um retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi pouco desenvolvido. Encontram-se alguns grãos de secreção no domínio apical, sugerindo fenómenos de exocitose para o lúmen [34].

## CANAIS EXCRETORES

Os canais excretores são os que possuem maior diâmetro e resultam da confluência dos ductos estriados. O tipo de epitélio varia ao longo da sua extensão. No primeiro segmento, a montante, o epitélio é do tipo colunar tipo pseudo-estratificado com algumas células basais mais pequenas. Ao longo do trajecto até à superfície, este tipo de epitélio é gradualmente substituído por epitélio estratificado. A este nível da rede canalicular, o produto segregado é também modificado com a produção de um componente mucoso [34].

## VASOS DA MUCOSA ORAL

A vascularização da mucosa bucal é formada por uma rede muito densa de ramos originários da artéria carótida externa e dos seus ramos maxilares, facial e lingual. Existem numerosas arteríolas na submucosa que se dispõem paralelamente à superfície, de onde se origina uma densa rede capilar, sem sistematização aparente, e que se dirige para a lâmina própria, onde, em algumas regiões, se dispõem sob a forma de ansa ao nível das papilas conjuntivas [34].

## INERVAÇÃO DA MUCOSA ORAL

A mucosa oral é bastante innervada principalmente com um componente sensitivo, mas também com fibras do sistema nervoso autónomo. Os nervos, trigémeo, facial, glossofaríngeo e vago, são os troncos que originam os ramos da submucosa, de onde saem pequenos feixes nervosos da lâmina própria e da lâmina basal. Algumas fibras têm terminações livres que penetram o epitélio e que se relacionam com as células de Merkel já descritas. As principais sensações detectadas são a temperatura, a dor e as sensações tácteis e gustativas já descritas [34].

## TIPOS DE MUCOSA ORAL

Considerando a estrutura e a fisiologia da mucosa oral, podemos sistematizar as diversas regiões em três tipos: a mucosa mastigatória, a mucosa de revestimento e a mucosa especializada [34,4].

## MUCOSA MASTIGATÓRIA

A mucosa mastigatória corresponde às áreas da cavidade bucal que primariamente contactam com o bolo alimentar durante a mastigação: palato duro, gengiva e, segundo alguns autores, também algumas áreas do dorso da língua [37].

As áreas mastigatórias onde há maior abrasão e tensão mecânica são revestidas por uma mucosa com epitélio queratinizado, com características morfológicas específicas, de forma a responder às necessidades fisiológicas [37].

O epitélio do palato duro e das gengivas é espesso, com muitas camadas de células e, por isso, com muitas papilas epiteliais que se destinam a melhorar a adesão ao tecido conjuntivo subjacente e a facilitar a nutrição das várias camadas celulares do epitélio [36]. A lâmina própria é pouco espessa e a submucosa é praticamente inexistente, criando-se assim uma base sólida que facilita funções como a mastigação e a deglutição, ao aumentar a resistência ao atrito e ao trauma. Estas características explicam o facto de as anestésias locais por infiltração serem mais difíceis e também de existir menor edema nas inflamações e infecções desta mucosa, em comparação com o que ocorre nas áreas de revestimento [36].

Este epitélio apresenta, nas camadas mais superficiais, ortoqueratose ou, no mínimo paraqueratose para resistir ao stresse mecânico a que o tecido está sujeito. Os estratos mais apicais são constituídos tipicamente por células com grande quantidade de citoqueratina, que se acumula no seu citoplasma, enquanto os outros organitos involuem e o núcleo desaparece. As células tornam-se verdadeiras escamas de queratina, estando preenchidas por um material opaco e impermeável constituído por um complexo de grânulos de querato-hialina e filamentos intermediários do citoesqueleto, a citoqueratina [37].

A queratina constitui um factor de protecção adicional que diminui a necessidade de o epitélio possuir maior número de camadas celulares [36]. Estes estratos queratinizados resistem a agressões mecânicas, biológicas e químicas, e previnem ainda a desidratação e perda de calor. A sua espessura é variável e depende da área da mucosa oral, da sua função e da diferente exposição ao trauma e ao atrito [37].

## PALATO DURO

O palato duro corresponde à região anterior do palato. Possui uma crista mediana e pregas palatinas transversais irregulares mais ou menos paralelas entre si, que se encontram revestidas por uma mucosa firme e imóvel, com uma coloração rosa claro. Esta região funciona como apoio para o dorso da língua, ajudando na mistura da saliva com o bolo alimentar, desempenhando um papel importante na mastigação e nas fases iniciais da deglutição. Considerando estas funções, é importante a existência de uma boa aderência do epitélio à submucosa bem como uma grande espessura epitelial, reforçada por queratina. A mucosa do palato duro é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado com uma espessura, em média, de 320 µm e uma queratinização superficial muito regular (ortoqueratinização) [37]. Estas células quase não têm glicogénio e o seu citoplasma está repleto de citoqueratina, de seis tipos diferentes, com pesos moleculares a variar entre os 47kD e 67kD [37].

A lâmina própria é de pequenas dimensões e não existe submucosa na região mediana. A submucosa só se encontra na região lateral, conferindo a este nível um aspecto mais “acolchoado”. Nestas áreas, e na área posterior, é mais frequente encontrar glândulas salivar minor [37]. A imobilidade característica da mucosa do palato duro é obtida, em parte, pela ausência da submucosa e pela inserção directa da lâmina própria no osso [37].

O epitélio do palato duro possui uma vascularização moderada a elevada com papilas epiteliais/conjuntivas com uma distribuição densa e regular. Estas papilas correspondem a cerca de 20 a 25% da espessura epitelial [37].

## GENGIVA

A região da gengiva que reveste o osso alveolar é coberta por uma mucosa do tipo mastigatória. Tem coloração rosa pálido e, tal como a mucosa mastigatória do palato duro, também é firme, dura e imóvel. Este tipo de mucosa cobre apenas a chamada gengiva inserida que cobre o osso alveolar. A restante gengiva mais afastada do dente é denominada mucosa alveolar.

O epitélio da gengiva tem em média 200 a 300  $\mu\text{m}$  e apresenta-se paraqueratinizado em 70% da sua área, sendo observáveis núcleos nas camadas celulares superficiais. Os 30% da área restante, localizada mais próxima do dente, é ortoqueratinizada, não se observando núcleos nas camadas celulares superficiais [34]. Encontram-se muitas células inflamatórias no epitélio nomeadamente: mastócitos, linfócitos e macrófagos [34].

A lâmina própria possui papilas conjuntivas de suporte e alimentação, que são compridas (200  $\mu\text{m}$ ) e estreitas, existindo cerca de 100 papilas por  $\text{mm}^2$  com uma forte inserção no osso [34]. Esta forte aderência, muito localizada ao osso, provoca retrações pontuais do epitélio conferindo à superfície um aspecto pontilhado tipo casca de laranja [37].

## MUCOSA DE REVESTIMENTO

A mucosa de revestimento apresenta-se macia e húmida e possui bastante elasticidade, o que lhe permite ser facilmente estirada ou comprimida. As áreas não mastigatórias incluem a face interna do lábio, o palato mole, a úvula, os pilares amigdalinos, o trígono retromolar, a mucosa jugal, o pavimento da boca e a face ventral da língua. A sua principal função é revestir a superfície da boca permitindo o livre movimento e distensão dos tecidos [37]. As áreas de revestimento, embora tenham que resistir a algumas forças de abrasão, estão sujeitas a menores traumatismos que a mucosa mastigatória, o que se encontra reflectido na sua estrutura.



O epitélio desta mucosa possui menos camadas do que as áreas mastigatórias e não é normalmente queratinizado. Em alguns casos pode existir paraqueratinização, caracterizada por um aumento da citoqueratina do citoplasma associada a moderada involução dos organitos citoplasmáticos, permanecendo um núcleo picnótico e alguns organitos citoplasmáticos [37].

O número de papilas epiteliais existente na mucosa de revestimento é muito variável, tal como as suas dimensões. Em geral, o número de papilas é menor do que o da mucosa mastigatória, podendo mesmo estas estarem ausentes em áreas em que a baixa espessura do epitélio não justifica a sua existência, dado que a nutrição do epitélio por difusão ocorre facilmente a partir dos vasos do conjuntivo.

A mucosa de revestimento localiza-se em regiões da boca onde, para além da protecção a traumatismos, é primordial uma boa mobilidade dos tecidos que possibilitem funções como a fala e a deglutição. A maior elasticidade deste tipo de mucosa é justificada pelo facto de existirem mais fibras elásticas ao nível do conjuntivo da lâmina própria e existir uma submucosa bem desenvolvida, onde se encontram glândulas salivar minor [34]. Estas características têm também repercussões fisiopatológicas, permitindo realizar as anestésias locais de forma mais fácil e rápida uma vez que a substância injectada nesta área se dissemina facilmente. No entanto, a sua estrutura também possibilita a disseminação de infecções e a instalação de edemas de forma abrupta e, por vezes, intensa [37].

## MUCOSA DO LÁBIO

A superfície do lábio pode dividir-se em três porções: a pele, a zona de transição e a mucosa.

A pele corresponde à região exterior do lábio. É uma pele fina que contém glândulas sebáceas e sudoríparas. Esta região está recoberta por um epitélio ortoqueratinizado [34].

A zona de transição está presente apenas na espécie humana. Possui uma coloração rosada intensa devido à sua vascularização exuberante. O seu epitélio é levemente paraqueratinizado ou mesmo não queratinizado. É nesta região que as papilas são mais densas e de maiores dimensões. Não existindo nesta localização glândulas sudoríparas ou sebáceas, necessita de ser lubrificada por saliva proveniente da mucosa [34].

A área mucosa do lábio apresenta um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, constituído por poucas camadas de células, com uma espessura duas vezes menor do que a encontrada no epitélio da gengiva, com papilas epiteliais menos exuberantes e por isso corada de rosa mais claro. [37].

Apesar do epitélio não ser espesso, observam-se papilas conjuntivas que, embora não tenham uma distribuição muito densa, permeiam o epitélio com uma extensão de dimensões semelhantes a dois terços da espessura epitelial. Estas papilas, que se dispõem paralelas entre si, são constituídas por um eixo vascular em ansa, importante para a nutrição do epitélio [37].

A camada basal do epitélio do lábio é constituída por células colunares de núcleo ovóide com uma grande actividade mitótica. As células migram rapidamente - 5/6 dias - para as camadas mais superficiais; durante esta migração ocorre um aumento das suas dimensões e uma alteração da forma, tornando-se poligonais.

No lábio a renovação celular é rápida - 14/15 dias - e a diferenciação das células ocorre logo nas camadas mais basais. Só nas camadas mais superficiais é que as células deixam de ser poligonais e passam a ser achatadas do tipo pavimentoso. O núcleo é conservado mesmo nas camadas mais superficiais, tornando-se redondo ou ligeiramente ovóide [37].

As especializações da membrana citoplasmática mais representativas são os desmossomas e as *gap junctions* que melhoram a adesão celular e facilitam a comunicação intercelular. Estas diferenciações morfológico-funcionais são mais evidentes nas camadas celulares intermédias, sendo muito exuberantes no epitélio da mucosa labial [37].

A submucosa do lábio apresenta glândulas salivar minor mistas com predomínio de secreção mucosa. Os ácinos são dispersos e, normalmente, encontram-se próximo da superfície. As células inflamatórias como os linfócitos, monócitos e macrófagos são muito abundantes na submucosa.

A mucosa do lábio possui elasticidade que permite a realização de funções com a fala e a mastigação. Observam-se numerosas pregas mucosas e epiteliais que facilitam a sua distensão e impedem a sua ruptura [36].

## MUCOSA JUGAL

A mucosa jugal tem coloração rosada e aspecto húmido, apresentando em áreas de dobras naturais bastantes pregas mucosas e, sobretudo, micropregas epiteliais.

O epitélio é estratificado pavimentoso não queratinizado. Possui uma grande espessura e assenta sobre uma lâmina própria muito vascularizada, o que lhe confere a coloração rosada. A lâmina própria possui bastantes papilas conjuntivas que são largas e baixas. O conjuntivo, a este nível, possui numerosas fibras elásticas que lhe conferem grande distensibilidade e elasticidade. A lâmina própria assenta sobre uma submucosa com tecido adiposo e glândulas salivar minor [36].

## PALATO MOLE E ÚVULA

O palato mole corresponde à região posterior do palato. O seu limite anterior continua pelo palato duro e o posterior termina na úvula e bordo livre, continuando-se pela face posterior do palato e mucosa respiratória da nasofaringe. A mucosa deste território tem uma coloração rosada, mais escura do que a do palato duro. Tem grande elasticidade e mobilidade permitindo a sua participação em funções como a articulação das palavras durante a fala e a deglutição [37].

O seu epitélio é do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado. Tem cerca de 280 µm, sendo assim bastante menos espesso do que o do epitélio da mucosa jugal [34].

O seu estrato espinhoso é pouco desenvolvido, quando comparado com outras regiões da mucosa de revestimento como o lábio e a mucosa jugal. Neste epitélio observa-se normalmente um número moderado de células inflamatórias entre os queratinócitos das várias camadas.

A lâmina própria é bastante espessa e possui muitas papilas conjuntivas de grandes dimensões e bem vascularizadas, de que depende a coloração rosada do palato. Possui grande concentração de fibras elásticas, o que lhe concede a sua elasticidade característica [37].

A sub-mucosa é pouco espessa, possuindo inúmeras células adiposas e grande densidade de glândulas salivares minor, principalmente, na região mais anterior. A sua

secreção abundante permite que esta área do palato apresente, habitualmente, um aspecto bastante húmido. A submucosa garante que a mucosa fica bem aderente aos músculos subjacentes possibilitando uma actuação de forma uníssona [37].

## PAVIMENTO DA BOCA

O pavimento da boca está situado por baixo da face ventral da língua, correspondendo à área em que esta repousa em situação de relaxamento. Nas faixas laterais, destacam-se as pregas sublinguais em forma de V. Na extremidade de cada uma destas pregas encontramos uma elevação, denominada carúncula sublingual, onde se localiza a papila do canal de Wharton [37].

O freio da língua é uma prega mediana que mantém a face ventral da língua e o pavimento da boca em estreita união anatómica e funcional.

A superfície do pavimento da boca apresenta-se húmida e brilhante com uma mucosa relativamente móvel, compressível e elástica.

Possui uma mucosa rosada com áreas azuladas, correspondentes a formações vasculares, que são facilmente observáveis através do epitélio, devido à ausência de queratinização e à sua baixa espessura - 180  $\mu\text{m}$  [34]. Este epitélio apresenta uma camada espinhosa muito pouco desenvolvida e com poucos desmossomas, provavelmente, por se situar numa área muito protegida da abrasão mecânica. Esta grande abundância de vasos e a reduzida espessura epitelial e, de algum modo, uma menor impermeabilização do epitélio, permitem que muitas substâncias, nomeadamente medicamentos, sejam absorvidas fácil e rapidamente quando ocorre administração sublingual [36].

A reduzida espessura do epitélio justifica que as papilas conjuntivas da lâmina própria sejam curtas, com o máximo de 30 $\mu\text{m}$ , e pouco abundantes, apenas cerca de 15 por  $\text{mm}^2$  [34]. A camada papilar e reticular da lâmina própria tem bastantes fibras elásticas e poucas fibras de colagénio, garantido a elasticidade necessária [36].

A submucosa possui uma grande concentração de tecido adiposo e contém, para além das glândulas salivares minor, as glândulas sublinguais. A submucosa do pavimento da boca não se encontra muito aderente aos músculos e aos ossos subjacentes, o que lhe confere alguma distensibilidade, permitindo a mobilidade da língua em funções tão importantes como a fala, a mastigação e a deglutição [37].

## TRÍGONO RETROMOLAR

O trígono retromolar é uma área com configuração grosseiramente triangular, localizada na região posterior da mucosa jugal, entre o maxilar superior e o maxilar inferior. Consideramos esta região independente da mucosa jugal, mais por factores clínicos do que por factores histológicos ou anatómicos, já que este espaço é onde se localizam com mais frequência as patologias neoplásicas ou potencialmente neoplásicas da boca.

O epitélio é do tipo pavimentoso estratificado, semelhante ao da mucosa jugal, mas de menor espessura e menor mobilidade. A lâmina própria está mais aderente aos planos profundos e possui uma microvascularização mais abundante.

## LÍNGUA – FACE VENTRAL

A face ventral da língua encontra-se coberta por uma mucosa de revestimento com epitélio pavimentoso estratificado de espessura reduzida, que permite a observação à transparência dos abundantes vasos do conjuntivo subjacente [37].

A lâmina própria apresenta numerosas papilas conjuntivas e caracteriza-se por possuir elevada densidade de fibras elásticas e poucas glândulas salivares minor. Esta mucosa é mais firme e menos distensível do que a do pavimento da boca. A submucosa está muito aderente aos músculos subjacentes, permitindo a sua mobilidade em uníssono, o que facilita as funções da fala, da mastigação e da deglutição [37].

A superfície desta mucosa apresenta-se tipicamente com coloração rosa, devido à vascularização subjacente, sendo também bastante húmida, apesar da escassez de glândulas que a caracteriza. Esta hidratação é conseguida devido ao contacto quase permanente da face ventral da língua com o pavimento da boca, área que mantém altos índices de produção de saliva, devido ao elevado número de glândulas mucosas e submucosas que possui.

## MUCOSA ESPECIALIZADA

A mucosa especializada encontra-se no dorso e bordos da língua. É constituída pelas papilas gustativas que são estruturas de diversos tipos, revestidas por um epitélio pavimentoso e com uma lâmina própria de tecido conjuntivo laxo.

## LÍNGUA - FACE DORSAL

A língua é um órgão constituído por fibras de músculo estriado esquelético com diferentes orientações. Na sua superfície podemos encontrar os três tipos de mucosa: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada. A língua é dividida pelo V lingual nos dois terços anteriores e no terço posterior. O V lingual resulta do alinhamento de papilas circunvaladas e representa uma linha de fronteira entre dois territórios, com origem embrionária distinta e com repercussão e prognóstico diferente, no caso da localização das lesões neoplásicas malignas ser anterior ou posterior a esta linha. Os dois terços anteriores da língua são mais móveis do que o terço posterior e possuem pouco tecido adiposo [34].

A face dorsal da língua é revestida por mucosa mastigatória e especializada. O epitélio mastigatório é do tipo ortoqueratósico ou paraqueratósico e o epitélio especializado é constituído pelos diferentes tipos de papilas [34].

## PAPILAS FILIFORMES

As papilas filiformes são as mais abundantes. Cobrem toda a superfície da face dorsal da língua incluindo os seus bordos. São estruturas cuneiformes com o ápice orientado para a faringe [37]. No seu conjunto, conferem à face dorsal da língua um aspecto semelhante a um tecido de veludo. As papilas filiformes têm 2 a 3 mm de comprimento e são cobertas por um epitélio pavimentoso ortoqueratinizado. Têm um papel relevante na mastigação e na mobilidade do bolo alimentar sobre a língua em direcção à orofaringe durante a deglutição. Não possuem calículos gustatórios mas são papilas muito inervadas com nervos sensitivos. A mucosa destas papilas apresenta terminações nervosas mielínicas no seu conjuntivo, de onde se originam ramos amielínicos que se dirigem para a camada basal do epitélio. Estas características explicam a grande sensibilidade táctil da língua [36]. A espessura do epitélio varia consoante a sua localização, sendo menos espesso junto ao V lingual, com cerca de 250 µm, e mais espesso junto à ponta da língua, com 800 µm. No âmbito celular destaca-se o elevado número de células de Langerhans e melanócitos aí existentes [34].

## PAPILAS FUNGIFORMES

As papilas fungiformes, com cerca de 1mm de comprimento, têm forma de cogumelo como o nome sugere. São menos abundantes localizando-se de forma dispersa pela superfície lingual, sendo mais frequentes junto à ponta da língua [36] e observam-se como pequenos pontos avermelhados dispersos na sua superfície. São mais rosadas do que as papilas filiformes, porque o epitélio pavimentoso estratificado que as cobre é menos espesso e não está queratinizado [36] ou está pouco queratinizado [37], deixando observar os vasos subepiteliais à transparência [36]. Têm uma função de sensibilidade gustativa, possuindo calículos gustatórios inervados por ramos terminais do nervo da corda do tímpano [34].

## PAPILAS FOLIÁCEAS

As papilas foliáceas são pouco abundantes e observam-se apenas na região posterior dos bordos laterais da língua. O seu número varia entre 4 e 10 e assemelham-se a dobras rudimentares, podendo sugerir folhas separadas por sulcos, onde se encontram os receptores gustativos [36].

## PAPILAS CIRCUNVALADAS

As papilas circunvaladas encontram-se no V lingual, não sendo visíveis quando a língua está relaxada no interior da boca. Existem entre 7 a 15 papilas com cerca de 3 mm de diâmetro com a forma de cogumelo, cobertas por um epitélio ortoqueratinizado. Os receptores gustativos encontram-se na sua face lateral e são inervados pelos nervos facial, glossofaríngeo e vago. O conjuntivo da sua mucosa é muito laxo e bastante vascularizado. Entre os sulcos, encontram-se os *ostia* das glândulas salivares minor de Ebner, que têm a particularidade de ser as únicas formações glandulares da boca puramente serosas [34].





# DOENÇAS POTENCIALMENTE MALIGNAS DA CAVIDADE ORAL

## DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

As Doenças Potencialmente Malignas (DPM) da cavidade oral, Potentially Malignant Disorders (PMD), descrevem-se como alterações morfológicas da mucosa oral em que algumas, mas não todas, são detectáveis clinicamente, apresentando um potencial acrescido de transformação maligna, tanto nas lesões visíveis como na mucosa aparentemente normal [43].

O conceito de pré-malignidade oral tem sofrido alterações de nomenclatura ao longo dos anos. Primeiramente, foi descrito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978, como lesões e condições orais pré-malignas [43], dividindo-se, classicamente, em lesões pré-malignas e condições pré-malignas [43]. As lesões pré-malignas descreviam-se como áreas específicas de mucosa oral morfollogicamente alteradas, clinicamente detectáveis, onde era mais provável que ocorresse cancro oral do que na mucosa aparentemente normal, podendo essa transformação demorar poucas semanas ou muitos anos [43].

As condições eram descritas como estados mais generalizados associados a um risco aumentado de cancro, nomeadamente cancro oral, em qualquer local da boca ou da orofaringe e que incluíam doenças sistémicas nas quais os sintomas orais eram apenas uma das suas manifestações [43].

Ao longo dos anos, encontram-se na literatura diversos termos para descrever estas lesões: lesões pré-malignas, lesões intra-epiteliais neoplásticas, lesões epiteliais precursoras e lesões epiteliais orais displásicas. Devido à quantidade de termos utilizados em diversas publicações, houve a necessidade de se estabelecer uma nomenclatura universal, para que todos os clínicos pudessem descrever de igual forma as lesões orais, demonstrando consenso entre as publicações [43].

Assim, em 2005, teve lugar no Reino Unido um *workshop* da Organização Mundial de Saúde (OMS) *Collaborating Centre for Oral Cancer and Precancer*, de onde saiu um relatório, que propôs uma nova terminologia que pudesse ser globalizada e utilizada por todos os clínicos e investigadores dedicados à Patologia Oral. Foi assim proposto, um novo termo para estas lesões e condições: Doenças Potencialmente Malignas.

Este novo termo foi assim decidido, uma vez que nem todas as lesões orais sofrerão transformação maligna e, sobretudo, devido ao reconhecimento da noção de campo de cancerização, no qual toda a mucosa da via aero-digestiva superior se encontra susceptível aos mesmos factores de risco, podendo toda esta mucosa sofrer transformação displásica e/ ou transformação maligna [43].

O termo actualmente utilizado por clínicos para descrever a lesão propriamente dita, é de lesões epiteliais precursoras, denominação utilizada na última monografia de Tumores de Cabeça e Pescoço em 2005 pela OMS [43].

Dentro do espectro das doenças potencialmente malignas, descrevem-se várias lesões: leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e lesões do palato em indivíduos com práticas tabágicas aberrantes. Descrevem-se também as condições sistémicas potencialmente malignas (CPM): fibrosa submucosa, líquen plano, lesões líquenóides, lúpus eritematoso discóide, disqueratose congénita, sífilis, imunodepressão, candidíase hiperplásica crónica, epidermólise bolhosa, síndrome de Plummer-Vinson (disfagia sideropénica), xeroderma pigmentosum, queratoacantoma, estados de má nutrição, deficiência de vitamina A, B, C e doença do enxerto-versus-hospedeiro (DEVH) [43, 44].

Neste trabalho, optámos por usar a divisão de lesões e condições potencialmente malignas, apenas por uma questão de organização, reconhecendo, no entanto, que estas lesões e condições pertencem todas ao espectro contínuo de campo de cancerização da boca e orofaringe, em consonância com o conceito de Pré-cancro oral [43].

O conceito de pré-cancro oral baseia-se em quatro princípios de evidência científica[43]:

- 1) Está relatado na literatura a transformação maligna de lesões previamente identificadas como lesões potencialmente malignas;
- 2) Nas margens dos carcinomas pavimento-celulares (CPC), identificam-se lesões potencialmente malignas, especialmente leucoplasias e eritroplasias;

3) Em termos anátomo-patológicos, as doenças potencialmente malignas, partilham características morfológicas e citológicas com os carcinomas, mas sem a invasão profunda, característica dos tumores malignos;

4) As doenças potencialmente malignas partilham, ainda, características cromossomais, genéticas e moleculares com os carcinomas da cavidade oral e orofaringe.

Em muitos estudos são descritos como factores de risco associados ao carcinoma da cavidade oral: o tabaco, o álcool, os fenóis, a noz de bétel, as infecções virais, bacterianas e fúngicas, a imunodepressão, o trauma mecânico repetido ou persistente e localizado, as reacção electro-galvânica, a radiação, a genética, a desactivação de genes supressores de tumor, a activação de oncogenes e os estados de malnutrição [43].

Considerando que existe um processo de transformação maligna numa mucosa comum à via aero-digestiva superior e, que nesse processo, existe previamente uma transformação displásica, admitem-se que os factores de risco para as doenças potencialmente malignas são semelhantes [43, 44].

As lesões potencialmente malignas têm uma prevalência de 1% a 5% na população geral [44-45], sendo entre os 50-70 anos de idade que se regista a maior incidência o que, curiosamente, corresponde a um período de cerca de 5 anos antes da idade mais frequente do cancro oral. No entanto, cerca de 5% das lesões potencialmente malignas, ocorreram em indivíduos com menos de 30 anos. O local mais comum de ocorrência de uma lesão potencialmente maligna é a mucosa jugal, seguida da gengiva, língua e pavimento da boca [44, 45].

As lesões potencialmente malignas são, frequentemente, assintomáticas e apresentam uma taxa e um tempo de transformação maligna imprevisível. Estas características podem condicionar um diagnóstico tardio e obrigam a um seguimento eficaz e longo, de forma a garantir uma detecção precoce das situações de malignização [43, 44].

As lesões potencialmente malignas podem ser lesões únicas localizadas, não associadas a nenhuma doença, ou lesões associadas a um estado mais generalizado de doença [43, 44].

Estudos revelam que existe ainda um grupo de doentes, com doença potencialmente maligna múltipla, que apresentam maior incidência de transformação maligna, reflectindo uma provável instabilidade generalizada de toda a mucosa oral (campo

de cancerização). De acordo com alguns estudos, a patologia multifocal generalizada de toda a cavidade oral, deveria ser um marcador de risco de carcinoma pavimento-celular, não apenas da cavidade oral mas de todo o tracto aero-digestivo superior [47, 48, 49].

A biópsia é obrigatória para o diagnóstico definitivo das lesões potencialmente malignas. A displasia é o principal factor preditor de futura transformação maligna [43].

Os doentes que apresentam doença potencialmente maligna multifocal ou disseminada a toda a cavidade oral, representam um grupo específico com alto-risco de transformação maligna e constituem um importante desafio de diagnóstico e tratamento. Este grupo, necessita de um seguimento mais frequente, com um mapeamento feito através de múltiplas biópsias [50]. Acresce o facto de os doentes com os principais factores de risco para estas lesões, tabaco e álcool, não terem perfil de procura de assistência médica frequente, nomeadamente, profissionais de saúde oral.

A informação da população sobre estas lesões é ainda muito baixa, apesar dos rastreios realizados e de alguma divulgação esporádica nos meios de informação. O facto de muito doentes desconhecerem que devem olhar regularmente para a sua boca, fazendo um auto rastreio, associado ao desconhecimento sobre o tipo de lesões que os deve levar a procurar o médico, pode contribuir para o diagnóstico tardio destas patologias. As doenças potencialmente malignas são ainda entidades pouco faladas no meio médico pelo que, muitas vezes, o seu diagnóstico tardio também se pode dever ao eventual insuficiente conhecimento dos médicos assistentes sobre a patologia oral [44, 45, 46].

Tanto nas lesões potencialmente malignas como no cancro oral, o diagnóstico precoce é a chave do tratamento e altera drasticamente a mortalidade e a morbilidade destes doentes. O prognóstico dos carcinomas T1/T2 é completamente distinto do prognóstico dos T3/T4 [44].

## TIPOS DE LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS

### LEUCOPLASIA

Por definição, da OMS, em 2005, a leucoplasia é uma placa branca com um risco de malignização variável, que só é diagnosticada quando se excluem outras doenças conhecidas que não apresentem risco aumentado de cancro. Nesse sentido, o termo leucoplasia só deverá ser usado clinicamente para descrever uma lesão branca, depois de excluídos outros diagnósticos específicos [43, 44].

A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais prevalente. Afecta aproximadamente 2% a 3% da população e, predominantemente, homens entre os 50 e os 65 anos de idade. Na população com 70 anos ou mais, a leucoplasia apresenta uma prevalência de 8% nos homens e 2% nas mulheres e afecta menos de 1% da população masculina, com menos de 30 anos. No entanto, a ocorrência de leucoplasia em indivíduos jovens tem vindo a aumentar. Os principais factores de risco são o tabaco e o álcool, o que explica que a leucoplasia seja cerca de seis vezes mais frequente em fumadores [43, 44].

Histologicamente, pode apresentar atrofia ou hiperplasia (acantose) e apresentar, ou não, displasia. Caracteristicamente tem um padrão de comportamento variável e imprevisível, com tendência para a transformação maligna [43, 44]. Os locais de maior ocorrência de leucoplasia são a mucosa mandibular e a jugal (aproximadamente metade das leucoplasias na evidência científica a nível global). No entanto, nos países ocidentais, o pavimento da boca e a face ventro-lateral da língua são as principais áreas afectadas.

Baseada na clínica, a OMS faz a seguinte classificação das leucoplasias:

Homogéneas:

- lesões brancas uniformes, flácidas, finas e que mostram fissuras rasas na superfície da queratina.

Não-Homogéneas:

- Eitroleucoplasia mosqueada – Lesão branca e vermelha, predominantemente branca.
- Nodular – Pequenas formações polipóides individualizadas.
- Verruciforme – Superfície enrugada.

Com base nesta classificação, o grupo de trabalho da OMS, em 2005, concluiu que as lesões de maior risco são as que apresentam componente branco e vermelho – eritroleucoplasias e as já referenciadas lesões múltiplas/multifocais [43, 44, 53].

Está ainda descrito um grupo específico de doentes com leucoplasia, que apresentam uma entidade conhecida como Leucoplasia verrugosa proliferativa, caracterizada por lesões múltiplas de leucoplasia, estendendo-se por uma grande área de mucosa [43, 44]

A leucoplasia corresponde a um diagnóstico clínico provisório sendo, no entanto, mandatário a realização de uma biópsia. O diagnóstico só é definitivo quando qualquer etiologia tenha sido excluída e quando a análise histopatológica, tenha eliminado qualquer outra entidade patológica conhecida [43, 51, 52].

O diagnóstico por microscopia pode englobar várias situações patológicas que, em média, têm a seguinte incidência: hiperqueratose sem displasia 80%; displasia 12%; carcinoma in situ 3%; e carcinoma invasivo 5% [43, 44, 54].

O risco de transformação maligna varia entre 15,6% e 39,2%, sendo mais elevado no sexo feminino do que no sexo masculino. O risco de malignização varia com o tipo de leucoplasia: homogénea de 1% a 7%; verruciforme de 4% a 15%; eritroleucoplasia de 18% a 47%; e verrucosa proliferativa de 80 a 100%. A localização associada a maior probabilidade de malignização é o pavimento da boca [43, 44, 54].

À luz da evidência actual, o tratamento da uma leucoplasia é, sobretudo se apresentar displasia, a excisão e o seguimento sistemático do doente. Se não apresentar displasia, poderá optar-se por realizar um seguimento clínico do doente de 6 em 6 meses. No entanto, o local da biópsia não representa toda a lesão, que poderá apresentar áreas displásicas que não foram biopsadas, [44, 54] advindo daí a importância de uma técnica complementar que permita realizar uma avaliação de toda a lesão da mucosa das áreas adjacentes [44, 54].

## ERITROPLASIA

A eritroplasia oral é considerada a lesão oral com maior risco de transformação maligna. A definição da OMS, de 1978, mantém-se actual, definindo-a como uma lesão vermelha que não pode ser classificada clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra entidade conhecida. São pouco frequentes: a máxima prevalência foi descrita por Hashibe *et al*, em 0,2% da população geral. Frequentemente, apresentam-se como

eritroleucoplasias, já descritas anteriormente. As eritroleucoplasias são mais frequentes no sexo masculino, dos 50 aos 70 anos de idade. Os locais mais frequentes são o pavimento da boca, a língua, a região retromolar e o palato mole. São frequentemente assintomáticas sendo, normalmente, o seu diagnóstico um achado ocasional numa observação de rotina do médico ou do próprio doente [43, 44].

Para o seu diagnóstico é obrigatório excluir: doenças imunes/inflamatórias, nomeadamente, gengivite descamativa, líquen plano oral eritematoso, lúpus eritematoso discóide, pênfígoides, reacções de hipersensibilidade, algumas infecções (candidíase eritematosa, histoplasmose), hemangiomas e o sarcoma de Kaposi [45, 46].

O risco de transformação maligna das eritroplasias é muito elevado, em média 50%, sendo, por isso, o diagnóstico precoce decisivo para alterar o prognóstico. O tratamento depende do resultado histopatológico e do estadiamento mas, na maioria dos casos, é a excisão cirúrgica. Poderá ser necessário radioterapia e /ou quimioterapia, consoante o seu estadiamento [43, 44, 45, 46, 54].

## LESÕES DO PALATO EM DOENTES COM PRÁTICAS ABERRANTES DE TABAGISMO

Culturalmente, o hábito de fumar o cigarro ao contrário é frequente na América Latina mas pouco frequente no resto do globo. Esta prática está associada ao aparecimento de lesões brancas e vermelhas no palato. O risco de transformação maligna é muito elevado: aquando do diagnóstico inicial, 83,3% dos casos apresentam-se como displasia e 12,5% como carcinomas [43, 44, 55].

## QUEILITE ACTÍNICA

A queilite actínica manifesta-se, predominantemente, em homens mais velhos, com história de exposição a radiação ultra-violeta. O epitélio pavimentoso do lábio encontra-se hiperplásico ou atrófico, com diferentes graus de queratinização, observando-se algumas atipias citológicas de grau variável e um aumento da actividade mitótica. No tecido conjuntivo subjacente, ocorre degeneração do colagénio e elastose. O diagnóstico implica a realização de uma biópsia, fazendo diagnóstico diferencial com o líquen plano oral do lábio. O risco de transformação maligna é ainda considerável e situa-se entre os 6% e os 10% [44, 56].

## CONDIÇÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS

### FIBROSE SUBMUCOSA

A fibrose submucosa é uma doença crónica associada ao hábito de mascar noz de bétel. Manifesta-se por uma rigidez da mucosa de todo o tracto aero-digestivo superior, mais frequentemente na cavidade oral, orofaringe e terço superior do esófago. Na boca, afecta sobretudo a mucosa jugal, a área retromolar, a língua e o palato mole. Deve-se a uma fibrose na lâmina própria e submucosa, com progressiva perda de mobilidade dos tecidos. Inicialmente os sintomas são de ardor e sensação de encortiçamento exacerbado por comidas picantes; podem observar-se vesículas e algum endurecimento dos tecidos. Durante a evolução da doença, podem formar-se bandas de fibrose com extensão a toda a mucosa, com a consequente limitação da abertura da boca. O risco de transformação maligna é elevado variando entre os 7% e os 26% [43, 57, 58].

### LÍQUEN PLANO

O líquen plano oral é uma doença inflamatória crónica, de carácter auto-imune, mediada por células T, de causa desconhecida. Nesta patologia, ocorre uma acumulação subepitelial de linfócitos T, aumentando a taxa de diferenciação do epitélio pavimentoso da mucosa oral, que origina hiperqueratose e eritema, podendo evoluir para ulcerações ou erosões.

A prevalência na população geral é de 0,1% a 2,2% e afecta, predominantemente, mulheres na faixa etária dos 40 anos de idade [43].

O diagnóstico é clínico e histológico. Descrevem-se 6 tipos de líquen plano oral: reticular, atrófico, erosivo, bolhoso, ulcerativo e papular. Manifesta-se, principalmente, na porção posterior da mucosa jugal e, menos frequentemente, na vertente lateral e dorsal da língua, na gengiva, no palato e no lábio. O risco de transformação maligna é pequeno mas não desprezível, oscilando entre os 0,4% e os 3,7%. O facto de a malignização poder demorar mais de 10 anos associado à sua prevalência implica, sempre, um longo e eficaz seguimento destes doentes que, se não forem observados com técnicas complementares não invasivas, podem ter que se submeter a várias biópsias de controlo [59, 60].



O tratamento é decidido ao longo do seguimento implicando sempre cuidados gerais, dos quais se destacam a dieta e a higiene oral com produtos pouco agressivos e sem álcool, corticóides tópicos ou sistémicos nas crises e, em casos refractários, outros fármacos imunossupressores [43, 44, 59, 60].

## LÚPUS ERITEMATOSO DISCÓIDE

O Lúpus eritematoso discóide é uma doença crónica mucocutânea, auto-imune, de causa desconhecida. A mucosa apresenta placas brancas queratinizadas, de bordos elevados, estriadas e com telangiectasias. A prevalência é de 5 em cada 10.000 indivíduos, afectando maioritariamente o sexo feminino. O tratamento tem como base a corticoterapia sistémica.

O risco de transformação maligna é desconhecido e ocorre, sobretudo, quando o Lúpus afecta o lábio. Estão descritas séries, como a de Ma *et al*, em que 5,5,% dos carcinomas pavimento celulares do lábio tiveram origem em lesões de lupus eritematoso disseminado, e a de Liu *et al* em que a malignização atinge os 6,8% [43, 44, 61, 62].

## DISQUERATOSE CONGÉNITA

A disqueratose congénita é uma doença hereditária rara, caracterizada clinicamente pela tríade: distrofia ungueal, pigmentação cutânea reticular e leucoplasia oral. É uma doença hereditária associada ao cromossoma X afectando, sobretudo, indivíduos do sexo masculino e que se manifesta normalmente entre os 5 e os 13 anos de idade. As lesões orais ocorrem em cerca de 80% dos casos, sobretudo na mucosa jugal, língua e orofaringe.

O risco de transformação maligna existe mas não é conhecida uma taxa de malignização quantificada [43, 44].

## IMUNODEPRESSÃO

A imunodepressão é considerada uma condição que predispõe a transformação maligna, nomeadamente, na cavidade oral. Manifesta-se sobretudo por leucoplasia, com predomínio nos lábios e comissuras labiais. Nestes doentes, é também mais comum a doença múltipla, pelo que o risco de transformação maligna se encontra muito aumentado.

O risco de transformação maligna é conhecido mas não se encontra quantificado, dependendo da manifestação oral correspondente, com a qual a imunodepressão se manifeste [44, 63, 64].

## CANDIDÍASE HIPERPLÁSICA CRÓNICA

Esta forma crónica de candidíase oral é caracterizada por uma placa branca e firme na mucosa jugal, nos lábios, no palato e na língua. Pensa-se que o risco de malignização ocorre devido à interacção da cândida com os efeitos do tabaco, o que explica a sua maior incidência em fumadores.

O risco de transformação maligna é conhecido mas não quantificado. No entanto, sabe-se que o risco de malignidade é cerca de 4 a 5 vezes mais frequente do que na leucoplasia, especialmente em doentes que mantêm os hábitos tabágicos [44, 63, 65].

## EPIDERMÓLISE BOLHOSA

A epidermólise bolhosa afecta cerca de 500.000 indivíduos mundialmente e é mais frequente entre os 20 e os 30 anos de idade. Manifesta-se clinicamente por bolhas e vesículas geralmente associadas a pequenos traumas da mucosa oral, sendo a localização mais frequente a mucosa jugal, a língua e o palato.

O risco de transformação maligna é elevado, cerca de 25%, sendo mais frequente na mucosa da língua e em áreas de ulceração crónica. Nestes doentes, está ainda descrita a associação a um aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma basocelular e de melanoma [43, 66].

## *XERODERMA PIGMENTOSUM*

O *xeroderma pigmentosum* é uma doença do tipo autonómica recessiva e está associada a transformação maligna cutânea. As manifestações orais ocorrem em jovens, frequentemente antes dos 20 anos de idade.

O risco de transformação maligna é incerto, embora alguns autores, como Chidzonga e Palatella, descrevam o desenvolvimento de carcinomas na língua e lábio de doentes com esta patologia [44, 67].

## QUERATOACANTOMA

O queratoacantoma encontra-se descrito como um nódulo sésil e firme com um espigão central de queratina, que se manifesta a maior parte das vezes na mucosa labial e lingual. O risco de transformação maligna é elevado, atingindo os 24%. [44, 68].

## DOENÇA DO ENXERTO-*VERSUS*-HOSPEDEIRO

A doença do enxerto versus hospedeiro é uma complicação comum em doentes tratados com transplante alogénico de medula óssea. O envolvimento oral ocorre em 80% dos doentes e manifesta-se por eritema, atrofia, ulceração, erosão, lesões liquenóides, xerostomia e dor intensa, podendo afectar qualquer região da cavidade oral.

O risco de transformação maligna está relatado na literatura por Salum *et al* e Montbeugnoli *et al* mas não está quantificado [44, 69, 70].

Em conclusão, a maior parte dos tumores de boca, bem como as suas complicações, podem ser prevenidas através de um diagnóstico precoce tanto do próprio tumor, como de uma eventual lesão potencialmente maligna que o possa preceder [44].

As lesões potencialmente malignas são frequentemente assintomáticas, pelo que o seu diagnóstico raramente é precoce, o mesmo acontecendo com o cancro oral [43, 44]. Justifica-se, por isso, a realização de observações periódicas da boca pelo próprio ou pelo médico assistente.

O incremento do ensino e conhecimento médico em patologia oral, nomeadamente, sobre as doenças potencialmente malignas, poderá ter um papel fundamental no diagnóstico precoce e no tratamento destas lesões e, conseqüentemente, na prevenção da sua transformação maligna, facilitando o diagnóstico precoce do cancro oral e melhorando, de forma determinante, o seu prognóstico [43, 44].

Os doentes portadores de lesões ou condições potencialmente malignas são considerados doentes de risco e, por isso, devem ser acompanhados em consulta de seguimento especializada.



# CANCRO DA MUCOSA ORAL

## EPIDEMIOLOGIA

Nas últimas décadas, registaram-se consideráveis avanços no conhecimento da carcinogénese da mucosa da boca, bem como no diagnóstico e na terapêutica do cancro oral. Seria de esperar que estes avanços se traduzissem em melhores resultados na taxa de sobrevivência aos 5 anos e em melhor qualidade de vida dos doentes que sobrevivem. Contudo, apesar de se terem concretizado alguns avanços no controlo da morbilidade, as taxas de sobrevida aos 5 anos têm-se mantido baixas e praticamente inalteradas. Globalmente, são diagnosticados cerca de 485 000 casos de cancro da mucosa oral por ano. Destes, aproximadamente 261 000 acabam por morrer pela evolução natural da doença [71].

Para a maioria dos países, a mortalidade está estimada em 3 a 4 casos por 100 000 habitantes nos homens e 1,5 a 2 casos por 100 000 habitantes nas mulheres [72]. Na Europa, a taxa de mortalidade aumentou, significativamente, entre as décadas de 1950 e 1980. Em França, nos últimos 20 anos, registou-se mesmo um aumento da mortalidade atribuível a cancro da mucosa oral nas mulheres [72].

Nos Estados Unidos da América, a taxa de mortalidade é de 4,1:100 000 habitantes nos homens e 1,5: 100 000 nas mulheres. Na raça negra a taxa de mortalidade é superior, 6,8: 100 000 [72].

Na União Europeia, o cancro da mucosa oral, em conjunto com o da orofaringe, área anatómica de fronteira, é a sétima neoplasia maligna mais frequente [73]. A França tem 15 000 novos casos por ano, com distribuição desigual entre géneros, com maior incidência nos homens [74] A Hungria ocupa a segunda posição e a Grécia e o Chipre apresentam a menor incidência. Portugal, Espanha, Alemanha e Suíça ocupam uma posição intermédia [75]. Tal como se verifica em França, existe desigualdade na distribuição da incidência de cancro da mucosa oral por género, sendo o diagnóstico mais frequente no sexo masculino. Na União Europeia, está estimado que o risco de um homem desenvolver um cancro oral ou da orofaringe é de 1,8% contra 0,37% nas mulheres [74]. Esta diferença de risco de desenvolvimento e de incidência da

doença entre homem-mulher (1,5:1), tem-se esbatido nos últimos anos e parece estar relacionada com mudanças dos hábitos femininos, com o aumento dos hábitos tabágicos e alcoólicos e da exposição solar, nos casos de cancro do lábio [76].

O risco de desenvolver um cancro da mucosa oral aumenta com a idade do indivíduo. Na maioria dos casos, a idade de apresentação ocorre após os 50 anos. Nos Estados Unidos da América, a média da idade de diagnóstico é 62 anos e apenas 6% dos casos surgem antes dos 45 anos [77]. Uma tendência para maior incidência em indivíduos mais jovens tem sido notada nos últimos anos [78] no entanto, ao contrário do que acontece em outras neoplasias malignas, a doença nas faixas etárias mais jovens não é mais agressiva e não está associada a agravamento do prognóstico [79, 80].

O nível socioeconómico também tem sido apontado, em vários estudos, como factor de risco ao demonstrarem que os indivíduos pertencentes a estratos sociais mais baixos apresentam maior incidência de cancro oral [81]. Esta associação parece ser ainda mais expressiva nos homens com mais de 50 anos [82, 83].

## **LOCALIZAÇÃO**

A boca pode ser subdividida em várias regiões e a incidência de tumores malignos varia de acordo com as mesmas. Na Europa e Estados Unidos da América, a língua é a localização mais frequente, representando 40% a 50% dos diagnósticos. Na Ásia, em particular nos países onde se masca noz de bétel e tabaco, a mucosa jugal é a região preferencialmente envolvida, contando com 40% dos casos [84]. A gengiva, o palato duro e o trígono retromolar são outras áreas muito frequentes para os tumores malignos primários da boca.

## **TIPO HISTOLÓGICO**

Em relação ao tipo histológico, o carcinoma pavimento celular é o mais comum, representando praticamente a totalidade dos casos de tumores malignos da cavidade oral. Ao nível da orofaringe, diagnosticam-se alguns casos de linfoma, devido à existência das amígdalas palatinas. Quando consideramos estatísticas que incluem apenas o território da boca, excluindo a orofaringe, o diagnóstico de carcinoma pavimento celular (CPC) representa um valor muito próximo dos 100% [85].

A etiologia do cancro da mucosa oral é multifactorial, distinguindo-se como principais factores de risco, o tabagismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas [86], à semelhança do que acontece em outras localizações de cancro da cabeça e pescoço [76].

Um indivíduo com hábitos tabágicos tem cerca de 38 vezes mais hipóteses de vir a desenvolver um tumor da mucosa oral [87]. Adicionalmente, o hábito de mastigar noz de bétel e tabaco, típico de algumas áreas geográficas, é também muito importante, embora com carácter endémico [88]. Estes factores são relevantes em acção individual ou actuando sinergicamente [87].

Além destes factores químicos, os factores físicos como a radiação ultravioleta da luz solar são igualmente pertinentes; relativamente à exposição solar, esta constitui um factor etiológico importante, mas só para as neoplasias do lábio [76].

No grupo dos factores biológicos, a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) parece ter igualmente significado [89]. Alguns autores identificam também relação entre doença peri-odontoal e cancro da mucosa oral [90]. Doentes com lesões ou condições consideradas potencialmente malignas, como já discutido no capítulo anterior, apresentam um aumento do risco de desenvolvimento de cancro oral [91].

Por oposição, são descritos como factores protectores uma boa higiene dentária e a inclusão de alguns alimentos na dieta. O consumo diário de frutas e vegetais, bem como de outros anti-oxidantes parece diminuir em cerca de 25% a probabilidade de génese de um tumor maligno na mucosa oral [92].

## PROGNÓSTICO

Os factores prognósticos descritos são o estadiamento da lesão à altura do diagnóstico, o tipo de tumor e o seu grau de diferenciação, a localização do tumor e o género do doente [76].

O prognóstico segundo a localização do tumor, nomeadamente a taxa de sobrevida aos 5 anos, apresenta valores distintos, consoante a área da boca envolvida. A média global da taxa de sobrevida do cancro da boca e orofaringe é de cerca de 50% aos 5 anos [76]. A localização de melhor prognóstico é o lábio, com 90% de sobrevida aos 5 anos. Outro factor prognóstico é o género, sendo a taxa de sobrevida global mais elevada nas mulheres [76].

Mas o factor que parece condicionar, de forma mais determinante, o prognóstico é o estágio de desenvolvimento do tumor, dada pelo estadiamento TNM. Veja-se o exemplo de um tumor da língua: no estágio I (estádio precoce) apresenta uma taxa de sobrevida aos 5 anos de mais de 80 %; contudo, no estágio IV esta taxa desce para 15%, mostrando que lesões em estádios avançados, apresentam significativamente pior prognóstico [93].

Nos casos não fatais, a morbilidade do cancro oral não deve ser desprezada. Muitos doentes apresentam patologia tumoral controlada mas permanecem com sequelas físicas ou psíquicas permanentes. Nas fases mais avançadas da doença, as alterações induzidas pelo tratamento (cirurgia ablativas e/ou radioterapia) podem afectar, limitar ou comprometer significativamente funções essenciais nas quais a boca participa, tais como a mastigação, a deglutição e a fala, podendo levar à desnutrição e/ou à depressão [76].

Actualmente, uma percentagem significativa dos diagnósticos é realizada nos estádios mais avançados da doença e, nos jovens, o atraso no diagnóstico parece ser ainda mais tardio. Nos últimos 40 anos, não existiram grandes progressos neste campo, apesar dos esforços de educação das populações [94,95]. O diagnóstico mais tardio nos jovens poderá ser justificado com o facto deste segmento da população estar menos alerta para a doença, apresentar menor grau de motivação para procurar o médico ou pelo facto de o médico apresentar baixo grau de suspeição de tumor maligno oral nesta faixa etária [96].

A baixa taxa global de sobrevida aos 5 anos tem com principal explicação este atraso no diagnóstico, normalmente em consequência da falta de acesso aos cuidados de saúde. Ainda que o doente consiga ter acesso a uma consulta atempada, em cuidados de saúde primários, o clínico poderá não estar habilitado para a identificação da lesão; além disso, pode haver um atraso na chegada do doente à consulta da especialidade. À dificuldade de acesso, acresce a baixa literacia em saúde, de uma forma geral. A população parece ter pouca consciência dos factores de risco, dos sintomas e/ou sinais de alarme do cancro oral [97].



## PREVENÇÃO

O diagnóstico da doença nas fases mais precoces é aceite, de forma generalizada, como a solução para o problema da morbilidade e mortalidade, associadas ao carcinoma da mucosa oral. Um rastreio que permita a identificação dos doentes e das lesões de risco e o seu acompanhamento é provavelmente, a orientação mais eficaz para tentar melhorar a taxa de sobrevivência e a morbilidade associada ao cancro oral [76,98].

A prevenção primária é outra via indispensável para o combate à doença, baseando-se no princípio das doenças evitáveis pela remoção dos factores de risco e pela promoção de factores protectores. Calcula-se que cerca de 75% dos casos de cancro da boca poderiam ser evitados pela eliminação dos hábitos alcoólicos e tabágicos [99]. No entanto, calcula-se que, após a cessação dos hábitos tabágicos, será necessário aguardar pelo menos 10 anos para que o risco dos ex-fumadores se aproxime dos valores dos não-fumadores [100]. A protecção dos lábios da incidência crónica da radiação solar é um factor protector do cancro do lábio. Nos países que controlaram o consumo de noz de bétel, a incidência desta patologia registou uma descida acentuada [101].

A promoção de literacia em saúde, contemplando a educação escolar mas também a educação para a saúde da população em geral, é um factor fundamental para prevenir o aparecimento das doenças. As políticas de saúde têm que promover activamente estilos de vida saudáveis, fornecer informação sobre a patologia em causa (factores de risco, sintomas e sinais de alerta que devem motivar ida ao médico) e facilitar o acesso aos serviços de saúde. Embora estas vertentes devam ser trabalhadas em simultâneo, é de salientar o papel fulcral da informação. Um indivíduo que seja devidamente informado e educado em relação ao cancro oral nomeadamente, sobre a evicção de factores de risco, a promoção de factores protectores e de estilos de vida saudáveis e, a identificação de sintomas e de sinais de alerta que devam motivar a ida ao médico, terá o benefício pessoal dessa informação, que se poderá repercutir nos familiares próximos e nos pares, servindo ele próprio de veículo de difusão da informação.

Os rastreios são um investimento essencial. O Rastreio é importante por permitir, numa só acção, contemplar as duas vertentes de prevenção primária e de detecção precoce da doença.

Assim, um rastreio organizado, poderá não só detectar alguns casos de doença potencialmente maligna ou tumor, como permitirá difundir informação às pessoas

que participam directamente no rastreio. Esta, que por sua vez, servirá de vector para a família, amigos e colegas de trabalho, levando assim à multiplicação geométrica da informação. Associado a estas iniciativas existe, normalmente, uma cobertura jornalística dos media, que vai ser também relevante para a difusão da formação nesta área [76,102].

Este investimento na formação deverá ser também dirigido aos médicos de medicina familiar e médicos dentistas para poderem orientar, com a maior precocidade, os doentes de alto risco para uma consulta de especialidade [103].

## **DIAGNÓSTICO**

Ao nível da consulta de especialidade, é realizada a história clínica com observação e palpação das lesões da boca e do pescoço, de uma forma mais específica. Considerando tratar-se de uma lesão suspeita, que poderá ter a aparência de leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, úlcera, tumefacção ou mesmo lesão infiltrativas deverá ser efectuada uma biópsia para realização de um exame anátomo-patológico, que é o teste padrão para o diagnóstico [104].

A imagiologia, nomeadamente, a tomografia computadorizada e, em alguns casos a ressonância magnética, são importantes para o estadiamento e programação da terapêutica cirúrgica ou não cirúrgica. A tomografia pode mostrar o envolvimento das cadeias ganglionares cervicais e eventuais invasões ósseas de estruturas adjacentes às lesões. A ressonância magnética é mais eficaz para detectar e documentar a invasão de tecidos moles, a expansão da lesão no músculo e no tecido conjuntivo da boca e a invasão neurovascular envolvente [105].

## **TERAPÊUTICA**

Várias modalidades de tratamento são aceites para o cancro da mucosa oral, nomeadamente, a cirurgia, a radioterapia ou ainda a quimioterapia. A escolha do tratamento médico ou cirúrgico e a necessidade de tratamentos, adjuvantes ou neoadjuvantes dependem da localização do tumor, do seu estadiamento, do impacto funcional e estético, das co-morbilidades existentes, da preferência do doente e da experiência da equipa [94].

As lesões em estádios precoces (estádios I – II) podem ser excisadas cirurgicamente, ou tratadas com radioterapia, externa ou braquiterapia, com impacto funcional e morbilidade física menor ou mesmo negligenciável [94].

O mesmo não se passa para lesões localmente avançadas (estádios III-IV), cujo comportamento é agressivo e associado a elevada taxa de insucesso de tratamento locorregional. Habitualmente, o tratamento destes doentes é decidido por uma equipa multidisciplinar, incluindo modalidades combinadas como a cirurgia e a radioterapia (com ou sem quimioterapia). A própria lesão, bem como os tratamentos, provocam morbilidade significativa, com impacto negativo a nível funcional e na qualidade de vida. Adicionalmente, sabemos que a taxa de sobrevida aos 5 anos piora, significativamente, quando comparamos os estádios I-II com os estádios III-IV [94].

Assim, as lesões mais precoces são resolvidas com tratamentos melhor tolerados pelos doentes e que correspondem a uma melhor taxa de sobrevida aos 5 anos. Daqui surge a importância da detecção precoce para que os tratamentos sejam mais eficazes, com menor morbilidade e menos complicações associadas.

Se por um lado não há dúvidas sobre a pertinência da doença, sobre o impacto em termos de morbimortalidade e sobre os custos económicos e sociais que esta representa para os doentes, para as suas famílias e para o Estado, é menos claro que tipo de rastreio deve ser implementado, em que população alvo, e que tipo de teste deve ser utilizado. Por outras palavras, se não há dúvida em relação à utilidade da detecção precoce, é necessário aferir a efectividade e relação custo-efectividade de um teste de rastreio.

Actualmente, nos Estados Unidos da América, nenhuma forma de rastreio via palpação directa e inspecção visual é realizada por rotina. Se por um lado há pouca evidência de que o rastreio possa ser efectivo na população em geral, ou em indivíduos de alto risco, há pouca capacidade de gerar essa mesma evidência, através de estudos randomizados.

Apenas um estudo randomizado controlado, na Índia, demonstrou a relação custo-efectividade do rastreio, quando realizado numa população alvo de homens acima dos 35 anos. Neste estudo, as medidas de custo-efectividade - LYS (life years saved) - mostraram que, se for rastreada a população de risco (homens acima dos 35 anos com hábitos tabágicos e alcoólicos), serão necessários 156\$ por LYS, enquanto que, na população em geral (homens sem factores de risco) esse custo será de 835\$ por LYS [106].

Outros três estudos que adoptaram modelos de decisão (modelo de decisão analítica) estimaram que há custo-efectividade incrementado, quando comparados os grupos de população rastreada e não rastreada [107,108,109].

A endoscopia de contacto não é, na verdade, um teste de rastreio para a população em geral, mas poderá funcionar como tal, quando utilizado para seguir doentes com condições ou lesões potencialmente malignas ou outros doentes de risco numa consulta especializada. Por outro lado tem também um papel importante a desempenhar como complemento da clínica e da anatomia patológica, na orientação de biópsias e no diagnóstico de lesões malignas da mucosa oral.

O nosso trabalho, ao testar a capacidade da endoscopia de contacto na detecção de malignidade, espera contribuir para o objectivo final comum, de melhorar o diagnóstico precoce desta patologia e, assim, ajudar a melhorar o prognóstico e a morbilidade do cancro da mucosa oral.

# **MUCOSA AERODIGESTIVA NORMAL**

## **ESTUDOS PRELIMINARES À ENDOSCOPIA DE CONTACTO**

Neste capítulo fazemos uma revisão sobre alguns aspectos morfológicos da mucosa oral normal que são aplicáveis, na generalidade, à restante mucosa aerodigestiva, com base em estudos de microscopia óptica, microscopia electrónica de transmissão e microscopia electrónica de varrimento, realizados na mucosa da boca e na mucosa da corda vocal. Decidimos englobar as imagens dos estudos realizados na corda vocal humana que, tal como as observações da mucosa oral, integraram vários trabalhos que procederam temporalmente a endoscopia de contacto. Alguns destes estudos foram efectuados para as nossas provas de aptidão científica e pedagógica realizadas na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e revelaram-se importantes para a compreensão das imagens preliminares obtidas por endoscopia de contacto. Algumas das imagens apresentadas neste capítulo fazem parte da monografia defendida durante estas provas.

### **EPITÉLIO DE REVESTIMENTO**

#### **QUERATINÓCITOS**

O epitélio estratificado pavimentoso caracteriza-se por os queratinócitos das camadas superficiais apresentarem um aspecto de mosaico, com forma poliédrica de eixo maior paralelo à superfície (Fig. 1, 2, 3). O aspecto geral da visão de aproximação vertical à superfície, como é o caso da observação por técnicas como a endoscopia de contacto (Fig. 2) e a microscopia electrónica de varrimento (Fig. 3), permite entender melhor o conceito de pavimento de mosaicos aplicado à classificação deste epitélio. A imagem deste tipo de epitélio em microscopia electrónica de varrimento materializa o conceito de disposição tridimensional das células, possibilitando ainda conceptualizar melhor a descamação típica da renovação celular destes epitélios (Fig. 3).

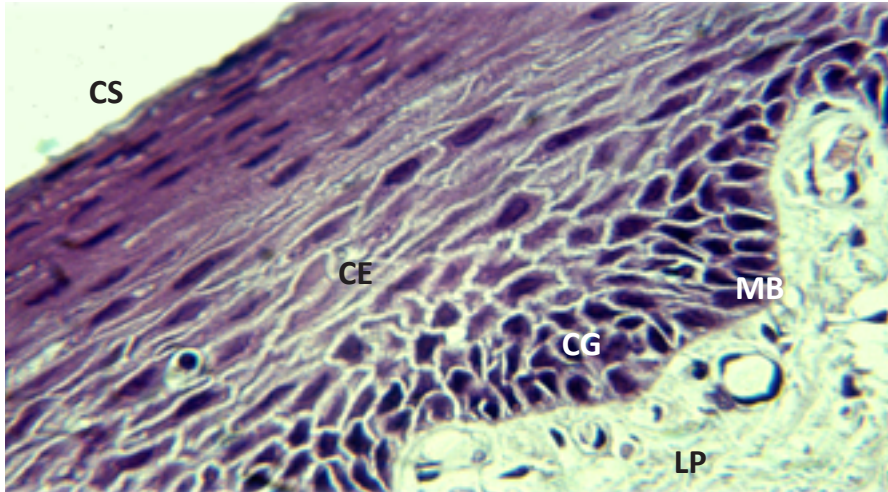


Fig. 1 - Hematoxilina eosina 250 X. Epitélio pavimentoso estratificado constituído por várias camadas de células. Junto da membrana basal (MB), mais próximo da lamina própria, tecido conjuntivo (LP), observa-se a camada germinativa (CG) constituída por células mais imaturas com relação núcleo-citoplasma aumentada. No sentido basal/apical a camada espinhosa (CE) constituída por células diferenciadas com menor relação núcleo citoplasma. Na face mais apical encontramos a camada superficial (CS) constituída por células em involução, com menos organitos e mais citoqueratina acumulada que, ao chegarem à superfície, acabam por descamar.

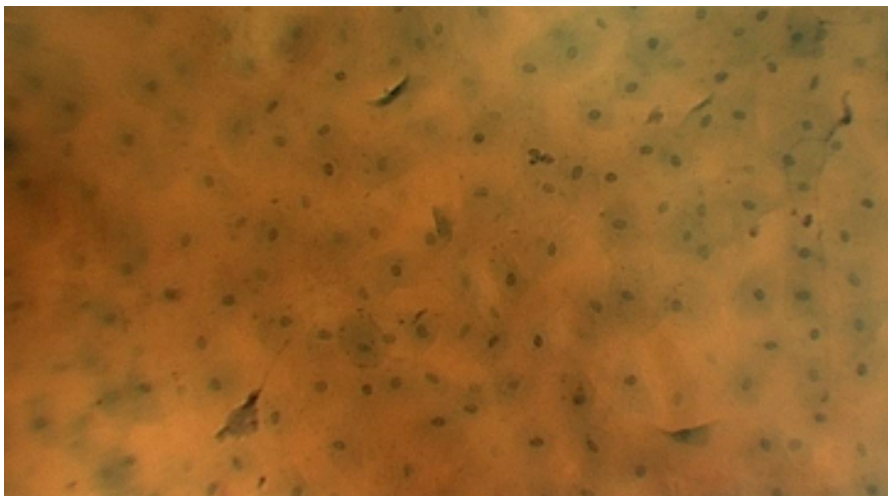


Fig. 2 - Endoscopia de contacto 60x. Epitélio pavimentoso estratificado. Núcleos celulares corados de azul escuro e o citoplasma corado de azul claro.

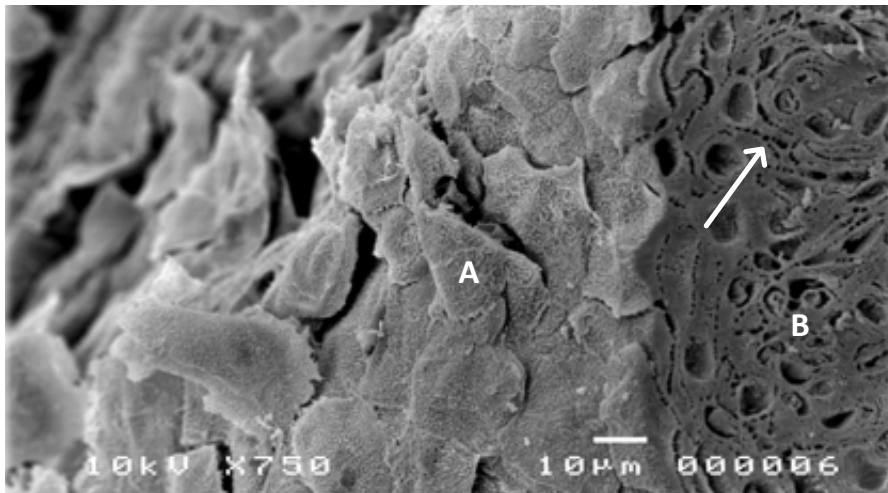


Fig. 3 - Microscopia electrónica de varrimento. Corda vocal humana. Epitélio pavimentoso estratificado. Observa-se a superfície com células em descamação (A). Corte em espessura permitindo observar as várias camadas celulares que caracterizam os epitélios estratificados (B). Observam-se pontes intercelulares nas camadas intermédias do epitélio (seta).

## CAMADA BASAL

A camada celular basal é constituída por células cilíndricas com eixo maior perpendicular à membrana basal. Possuem núcleo ovóide, apresentando uma relação núcleo-citoplasma grande, mais ou menos similar e constante em todas as células (Fig. 1, 4). Aqui ocorrem as mitoses que permitem manter o pool celular, como se pode comprovar (Fig. 5) numa preparação de imunocitoquímica com KI 67, que marca os núcleos das células na fase activa do ciclo celular entre a fase de G 1 e a mitose, observando-se marcação apenas das células das camadas mais basais.



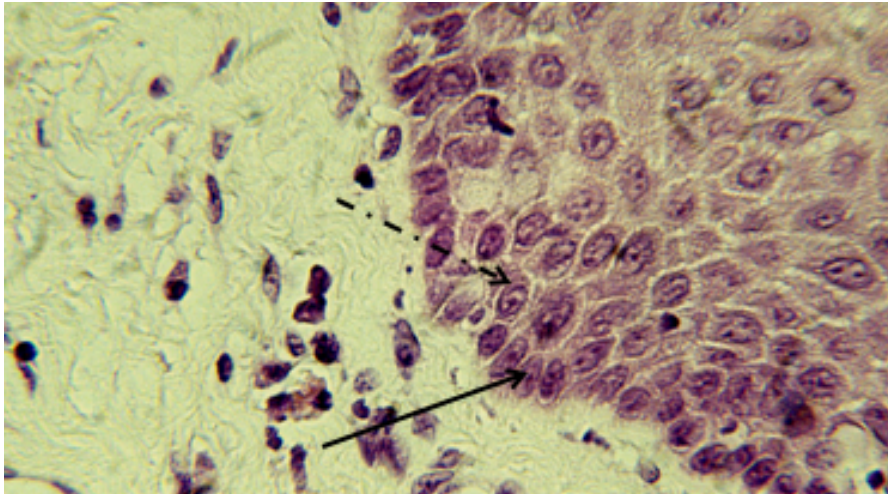


Fig. 4 - Hematoxilina eosina 400X. Epitélio pavimentoso estratificado. Corda vocal humana. Ampliação da camada germinativa ou proliferativa constituída por células cilíndricas ou prismáticas de núcleo grande e oval com eixo maior perpendicular à membrana basal (setas traço cheio). O citoplasma é escasso mas muito basófilo (seta descontinua).

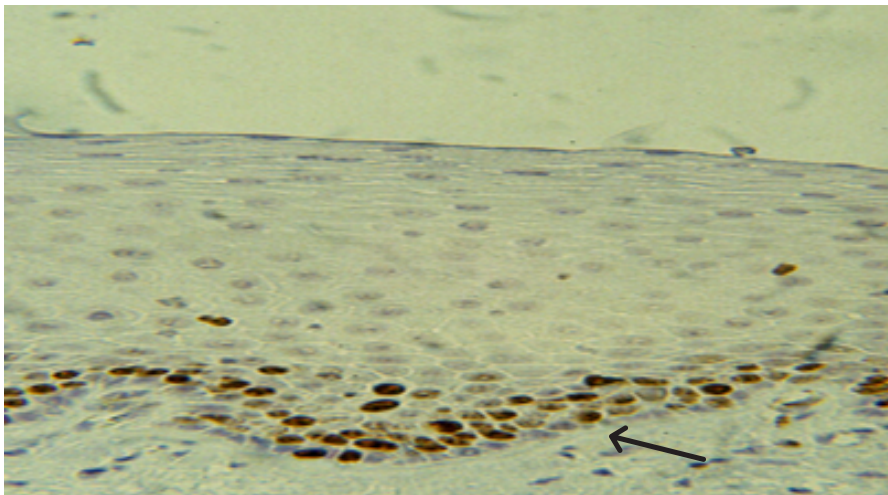


Fig. 5 - Imunocitoquímica 250 X Epitélio pavimentoso estratificado marcado com KI 67 (seta). Corda vocal humana. Observa-se marcação apenas nas camadas mais basais indicando a área em que ocorrem preferencialmente as mitoses. Note-se a bipolaridade do epitélio com zonas distintas de proliferação e diferenciação.



Através do estudo por microscopia electrónica de transmissão, podemos avaliar algumas das características ultraestruturais destes elementos celulares dos quais destacamos a elevada concentração de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 6), explicável pela imprescindível síntese proteica que se associa à actividade proliferativa e mitótica, e à produção de glicoproteínas que vão integrar a lâmina e membrana basal adjacentes (Fig. 6, 7). Observam-se, igualmente, inúmeras mitocôndrias com cristas mitocondriais muito desenvolvidas, o que sugere a produção abundante de energia, provavelmente relacionada com o transporte activo de substâncias através da membrana basal, por processos activos com consumo de energia.

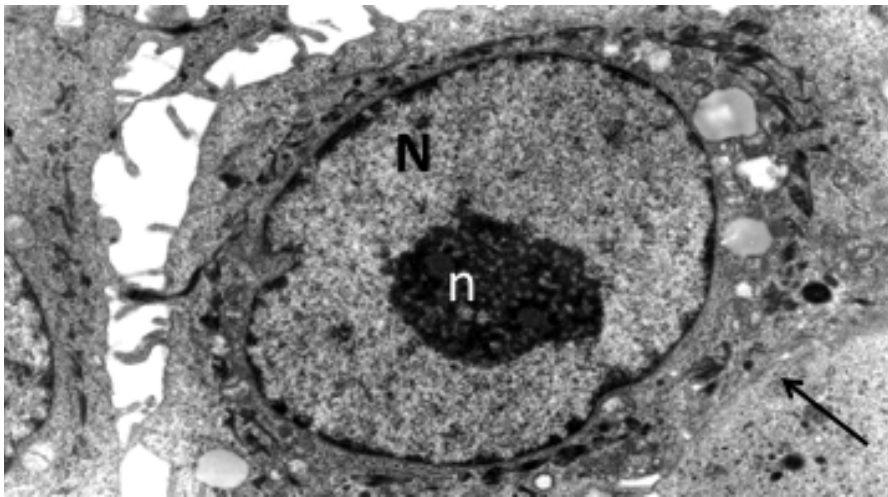


Fig. 6 - Microscopia electrónica de transmissão 6700X. Corda vocal humana. Observa-se queratinócito da camada germinativa. Observa-se a membrana basal à direita da figura (seta). Note-se a grande dimensão do núcleo, rico em eucromatina com limites bem definidos e regulares (N). Estas células apresentam um ou dois nucléolos do tipo reticular (n). O citoplasma possui retículo endoplasmático rugoso abundante, mitocôndrias de grandes dimensões ovais e com cristas bem desenvolvidas e possui os típicos filamentos intermediários de citoqueratina.

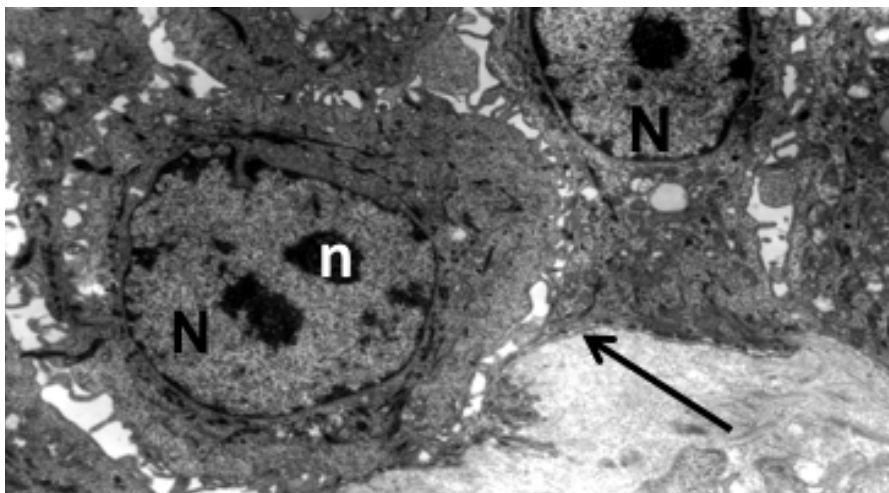


Fig. 7 - Microscopia electrónica de transmissão 5000X. Corda vocal humana. Observam-se queratinócitos da camada germinativa. A membrana basal (seta) e núcleos ricos em eucromatina com limites bem definidos e forma oval regular (N). Estas células apresentam um ou dois nucléolos do tipo reticular (n).

O citoplasma é rico em filamentos intermediários de queratina, como é típico dos queratinócitos. No entanto, este é o estrato celular com menor densidade de citoqueratina. A concentração de citoqueratina vai aumentando progressiva e gradualmente no sentido basal-apical (Fig. 6, 7).

O núcleo tem forma ovóide, de eixo maior perpendicular à membrana basal. As células possuem núcleo grande, bem delimitado e preenchido por eucromatina, o que demonstra o alto grau de actividade metabólica deste estrato celular (Fig. 6, 7). Os nucléolos são facilmente identificáveis e possuem aspecto reticular, observando-se um a dois por célula (Fig. 6).

## CAMADA ESPINHOSA

Estas células expressam na sua membrana citoplasmática, junções de adesão visíveis em microscopia óptica, sob a forma de pontes intercelulares ou de Shultz dando um aspecto geral de células com espinhos, origem da denominação de camada espinhosa ou intermédia (Fig. 8, 9). Estas formações correspondem a pontos de contacto intercelular reforçados pela presença de desmossomas, visíveis em preparações de microscopia electrónica de transmissão (Fig. 10).

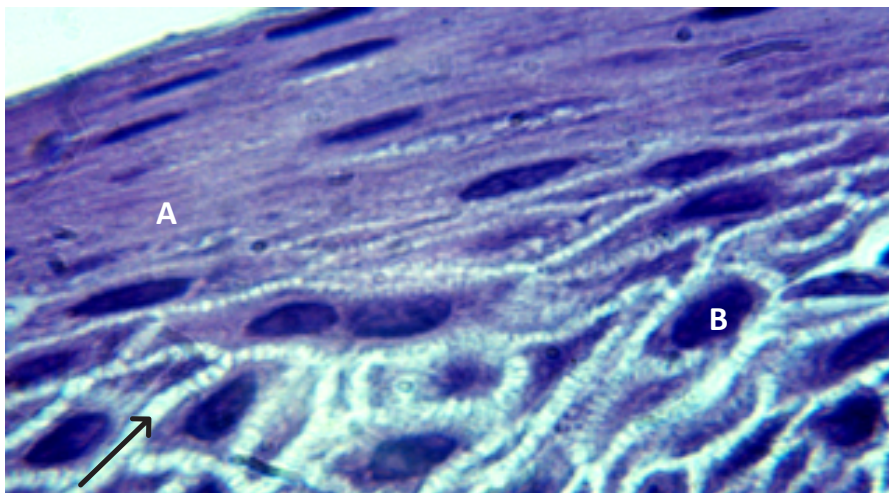


Fig. 8 - Microscopia óptica. Hematoxilina eosina 1000X. Corda vocal humana. Observa-se o contraste entre a forma das células e núcleos das camadas descamativas do epitélio estratificado pavimentoso (A) e as células da camada espinhosa (B). As células das camadas espinhosas têm uma forma mais poliédrica com uma relação núcleo/citoplasma maior. Nesta preparação observam-se bem as pontes de Shultz (seta).

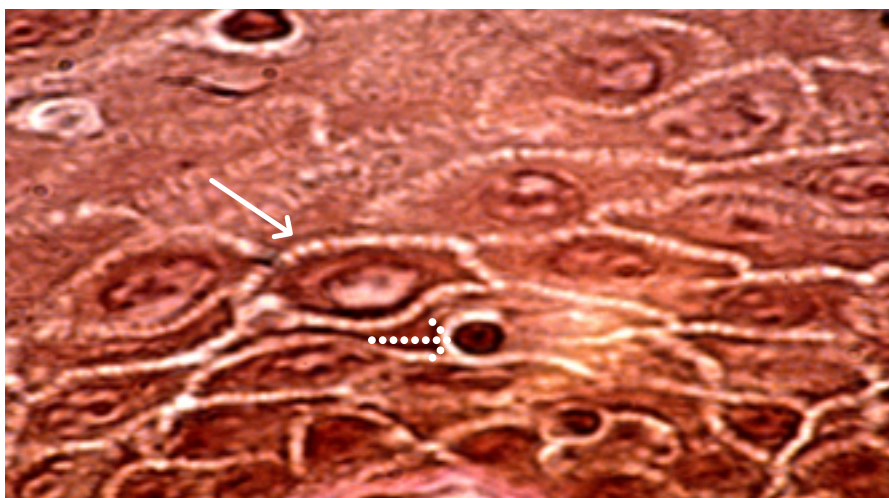


Fig.9 - Microscopia óptica 1000X. Corda vocal humana. Coloração base de técnica de imunocitoquímica com anticorpos anti citoqueratina de alto peso molecular e P.A.S.. Destacam-se as pontes de Shultz (seta). Detectam-se algumas células inflamatórias entre os queratinócitos (seta descontinua).

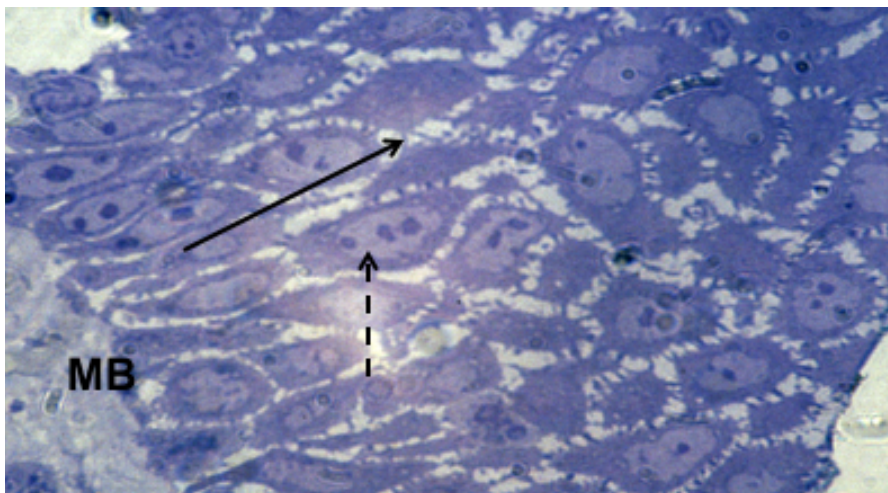


Fig. 10 - Microscopia óptica 1000X. Corda vocal humana. Corte semi-fino corado com azul de toluidina. Destacam-se as pontes de Shultz (seta). Observam-se células com mais de 2 nucléolos na camada intermédia (seta descontinua). A membrana basal pode observar-se à esquerda (MB).

Estas células são poligonais, com núcleo redondo ou um pouco ovóide, de eixo perpendicular à superfície ou à membrana basal. Durante o processo de amadurecimento vão diminuindo as dimensões do núcleo e aumentando as dimensões do citoplasma, existindo assim uma diminuição da relação núcleo-citoplasma. Verifica-se igualmente uma diminuição na concentração de retículo endoplasmático rugoso e os filamentos de citoqueratina são mais abundantes e observam-se menos mitocôndrias (Fig. 11). Os núcleos apresentam características semelhantes aos das células das camadas mais basais. Podem no entanto, identificar-se mais do que dois nucléolos reticulares por núcleo (Fig. 11). Neste estrato é frequente observarem-se células inflamatórias, linfócitos ou neutrófilos (Fig. 9, 10).



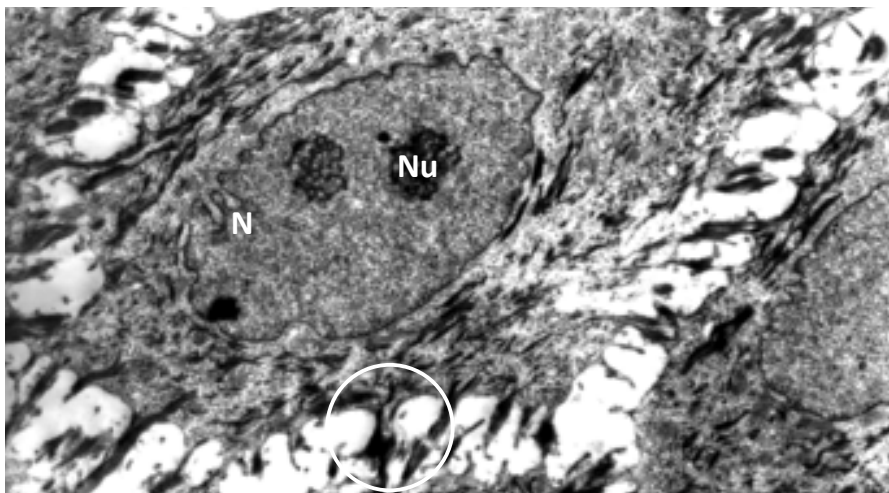


Fig. 11 - Microscopia electrónica de transmissão 8000X. Corda vocal humana. Observa-se queratinócito da camada espinhosa com núcleo (N) pouco electrodensio sugestivo de intensa actividade de síntese e nucléolos (Nu) de tipo reticular. Esta foto, que possui bastantes artefactos de retracção, foi seleccionada para melhor evidenciar a presença dos desmosomas a unir células adjacentes (círculo). Estes aspectos explicam o aspecto típico da camada espinhosa.

## CAMADA GRANULOSA

A camada granulosa corresponde ao início do processo de involução das células que iniciam a acumulação de grânulos de queratina no citoplasma, associado ao desaparecimento de alguns organitos e especializações de membrana com função de adesão celular. (Fig. 12).

## CAMADA CÓRNEA OU SUPERFICIAL

A camada córnea corresponde às células mais superficiais em fase de descamação (Fig. 8, 12, 13, 14). São células praticamente reduzidas a escamas com núcleo picnótico ou de dimensões reduzidas (Fig. 8,12). Possuem uma maior concentração de filamentos intermediários de citoqueratina que preenche praticamente todo o citoplasma (Fig. 12, 14), onde se encontram abundantes vacúolos e grânulos de glicogénio.

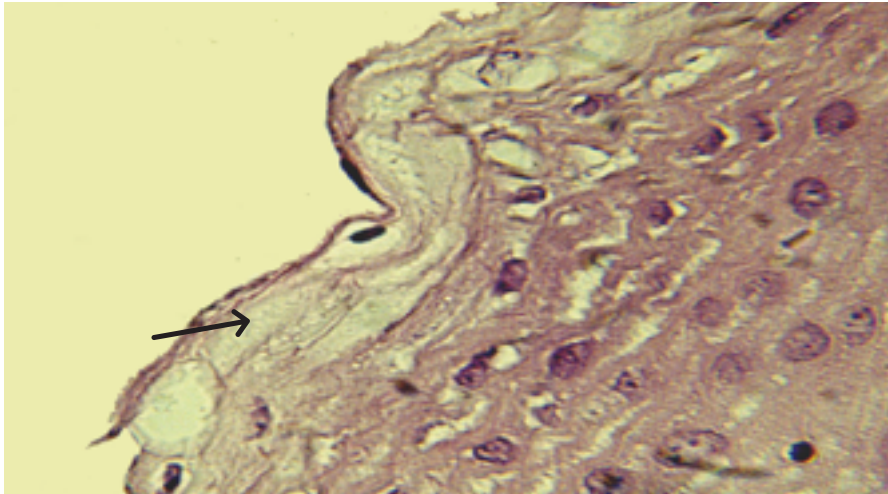


Fig. 12 - Microscopia óptica hematoxilina eosina 400X. Mucosa oral humana. Camadas mais apicais de epitélio pavimentoso estratificado. Note-se nas camadas mais superficiais células em processo de involução e a destacarem-se do restante epitélio por descamação (seta).

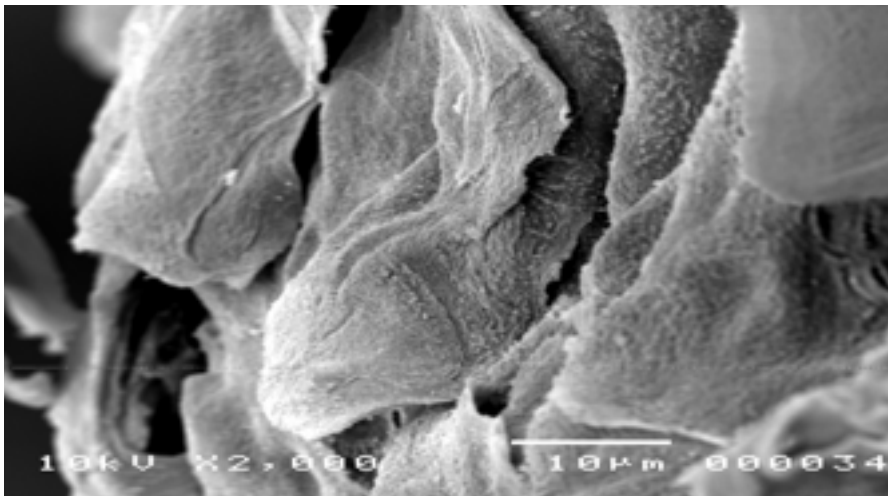


Fig. 13 - Microscopia electrónica de varrimento. Corda vocal humana. Observa-se o detalhe das células mais superficiais do epitélio pavimentoso estratificado em fase de descamação.

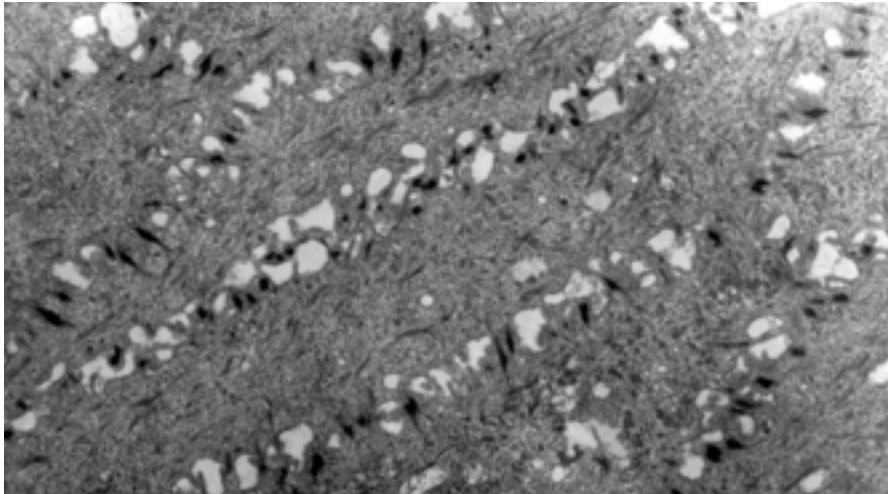


Fig. 14 - Microscopia electrónica de transmissão 6000X. Corda vocal humana. Camadas mais apicais de epitélio pavimentoso estratificado. Nas camadas mais superficiais as células possuem menos organitos, apresentando grande acumulação de citoqueratina no citoplasma. Observam-se inúmeras inclusões lipídicas e de glicogénio.

## OUTROS TIPOS DE CÉLULAS DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO

As células de revestimento do epitélio que descrevemos denominam-se queratinócitos e correspondem a 90% das células permanentes da mucosa oral. Existem outros três tipos de células residentes epiteliais, que representam 9% da população celular do epitélio, e que tivemos oportunidade de estudar em trabalhos anteriores: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. Estas células, apesar de não serem observáveis por endoscopia de contacto, são parte integrante destes epitélios - as células de Merkel e de Langerhans foram por nós estudadas na mucosa oral, e os melanócitos na mucosa das cordas vocais - e por isso, julgámos oportuno referi-las.

### CÉLULAS DE MERKEL

As células de Merkel foram descritas pela primeira vez em 1875 por Friedrich S Merkel, na camada basal da epiderme do focinho de toupeiras e porcos. Foram inicialmente descritas como umas células de citoplasma claro que se encontravam associadas a terminações nervosas intra epiteliais, de extremidades dilatadas. Desde as primeiras descrições foram identificadas em todos os vertebrados, desde os ciclóstomos aos mamíferos [110], estando identificadas na epiderme ao nível das pálpebras, faces

palmares e plantares, pontas dos dedos e pregas ungueais, ainda que a sua localização primordial seja as áreas perifoliculares da pele. São ainda descritas nas mucosas nasal, labial e bucal humanas e também na derme de fetos humanos [111].

As técnicas convencionais de coloração histológica e de microscopia óptica não permitem individualizar as células de Merkel. Estas células encontram-se normalmente nas três camadas mais basais do epitélio (Fig. 15). À observação por microscopia electrónica de transmissão, técnica electiva para estudos destas células, possuem um corpo celular em regra ovóide e prolongamentos ou esporões citoplasmáticos, que têm em média 30 a 40 nm de diâmetro e chegam a atingir 2,5  $\mu$ m de comprimento sendo o seu eixo ocupado por fibras de actina [112] (Fig.16).

O núcleo é normalmente oval e tem frequentemente lobulações [112]. A sua membrana citoplasmática possui desmosomas, especializações de membrana para adesão celular, localizados no corpo celular ou nos prolongamentos celulares, que mantêm a junção aos queratinócitos adjacentes [113]. No entanto, quando comparadas com as dos queratinócitos adjacentes, estas especializações são de pequenas dimensões e em número reduzido [114] (Fig. 17).

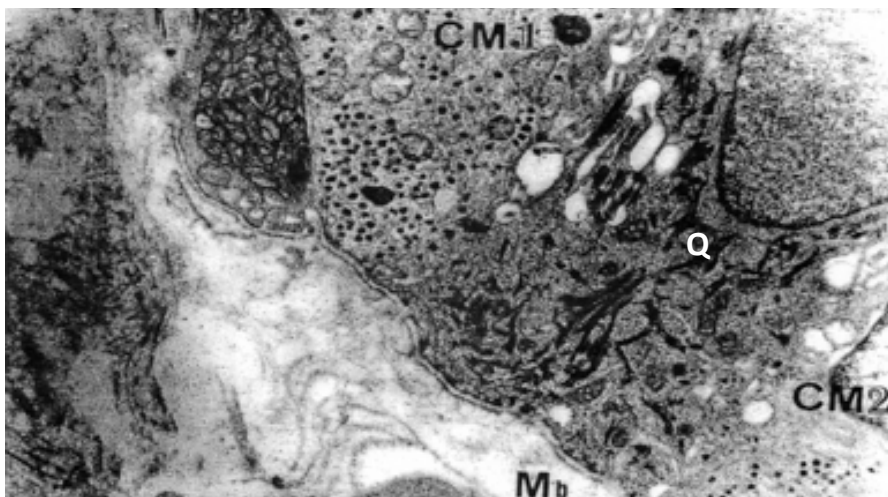


Fig. 15 - Microscopia electrónica de transmissão 3500X. Mucosa oral humana. Observam-se duas células de Merkel (CM) junto à membrana basal (Mb). O citoplasma que se apresenta menos electrodenso que o dos queratinócitos (Q) tem como característica mais típica a existência no citoplasma de grânulos de forma esférica limitados por uma membrana. Observamos estas estruturas dispersas por todo o citoplasma embora predominando no pólo basal das células e em áreas adjacentes a dendritos.





Fig. 16 - Microscopia electrónica de transmissão 4800X. Mucosa oral humana. Observa-se esporão de célula de Merkel cortado transversalmente (seta).

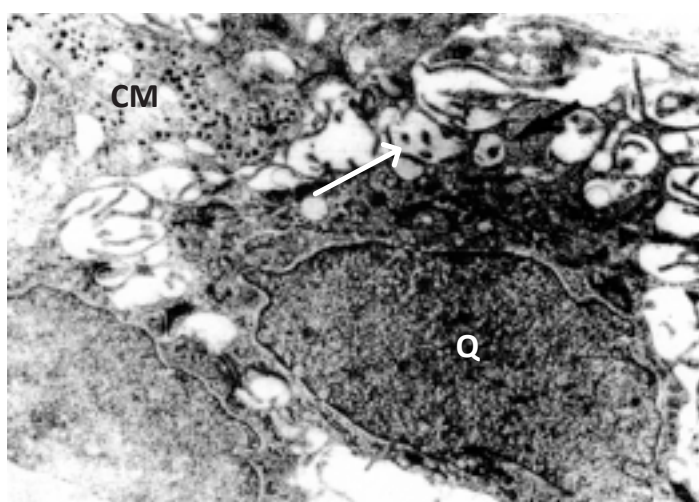


Fig. 17 - Microscopia electrónica de transmissão 4800X. Mucosa oral humana. Observa-se esporão de célula de Merkel (CM) cortado transversalmente (seta) em contacto com queratinócitos adjacentes (Q).

O citoplasma tem caracteristicamente uma densidade baixa em microscopia electrónica de transmissão, contendo uma baixa concentração de filamentos intermédios de queratina, o que contrasta com o observável nos queratinócitos [111] (Fig. 18). A sua principal característica identificadora, consiste na presença de grânulos citoplasmáticos densos, limitados por uma membrana com halo. Estes grânulos com 80 a 120 nm de

diâmetro são semelhantes aos encontrados nas células neuroendócrinas e contêm, conforme foi demonstrado por métodos imunocitoquímicos, péptidos e enolase específica dos neurónios [115]. Nas células mais envelhecidas, observamos uma diminuição do número destes grânulos. Estas células, que se encontram no fim do seu ciclo de vida, apresentam também núcleos mais pleomórficos com grandes invaginações da membrana nuclear (Fig. 18).

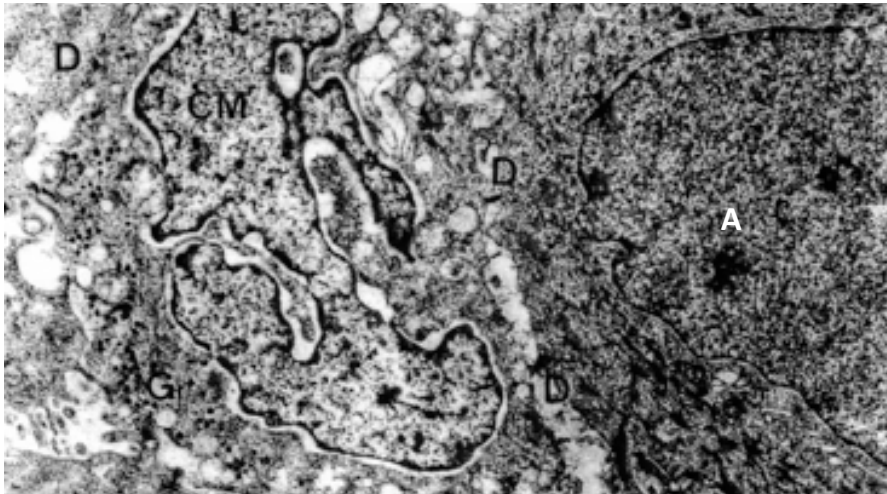


Fig. 18 - Microscopia electrónica de transmissão 4800X. Mucosa oral humana. Observa-se desmossomas na membrana citoplasmática desta célula de Merkel (D). Os desmossomas e os filamentos de queratina são característicos das células de Merkel (CM) tal como dos queratinócitos (Q). O aspecto deste núcleo muito pleomórfico e lobulado com invaginações da membrana nuclear muito numerosas e profundas. Estas células apresentam igualmente um número muito reduzido de grânulos citoplasmáticos densos que mantêm, no entanto, a sua morfologia, sugerindo tratar-se de uma célula de Merkel exaurida, envelhecida.

As células de Merkel contactam com longas fibras mielínicas através de uma área semelhante a uma sinapse. Na região de contacto o citoplasma da célula de Merkel é rico em mitocôndrias e grânulos, estando a sua membrana citoplasmática intimamente associada ao dendrito do neurónio [112]. No entanto, nem todas as células de Merkel são inervadas directamente [116,117].

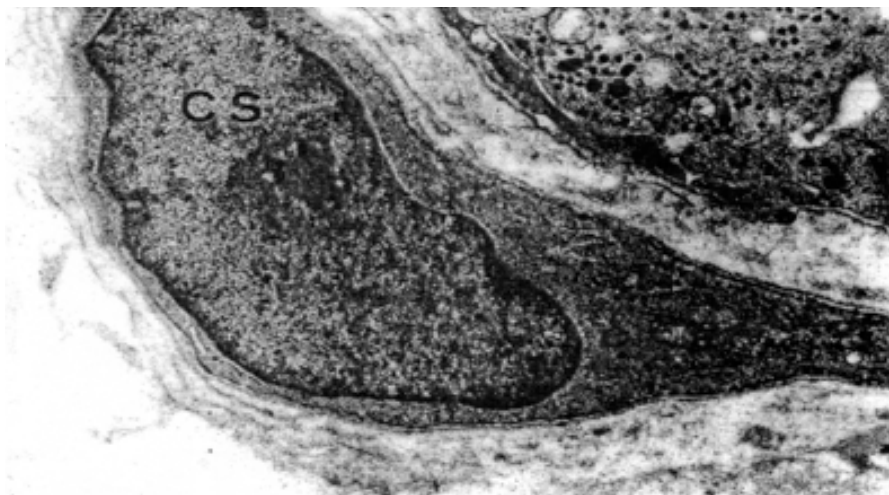


Fig. 19 - Microscopia electrónica de transmissão 4800X. Mucosa oral humana. Observa-se célula de Schwann. Para além dos dendritos intraepiteliais foram observadas estruturas nervosas subepiteliais ricas em mitocôndrias que são contíguas à membrana basal (Fig. 1, 2), na vizinhança de células de Schwann e de cortes de fibras nervosas (Fig. 3) constituindo um sinal de uma rica inervação da mucosa bucal.

Admite-se que algumas células não contactem com terminações nervosas intraepiteliais, mas muitos autores defendem que elas continuam pelo menos a depender da presença de neurotrofinas [118,119], necessitando assim da presença de uma terminação nervosa nas proximidades [120] (Fig. 19).

Estas células estão unidas através de pequenos desmossomas aos queratinócitos adjacentes e possuem prolongamentos citoplasmáticos. Coloca-se a hipótese destes prolongamentos servirem de sensores de deformação mecânica da epiderme ou das mucosas. Esta energia mecânica seria transformada em energia eléctrica, agindo a célula como um transdutor, que depois transmite os impulsos nervosos através dos discos de Merkel, formações semelhantes a sinapses localizadas entre a célula de Merkel e uma terminação nervosa [112,116].

## CÉLULAS DE LANGERHANS

As células de Langerhans são outro tipo de células residentes dos epitélios estratificados pavimentosos. São células dendríticas que se encontram nas camadas basais e intermédias dos epitélios [121]. Possuem características semelhantes aos macrófagos mas distinguem-se destes por possuírem grânulos de Bierbeck no seu

citoplasma [122]. Todas as células com grânulos de Bierbeck possuem antígenos CD1a (T6) e CD1 c (Fig. 20).

As células de Langerhans são do tipo APC (antigen presentig cells), que se relacionam directamente com linfócitos tipo T e B [123]. As células de Langerhans intervêm em vários processos histofisiológicos como no processamento e na apresentação antigénica, na migração celular, na interacção com linfócitos, na produção de citocinas, na acção enzimática e fagocitária [124].

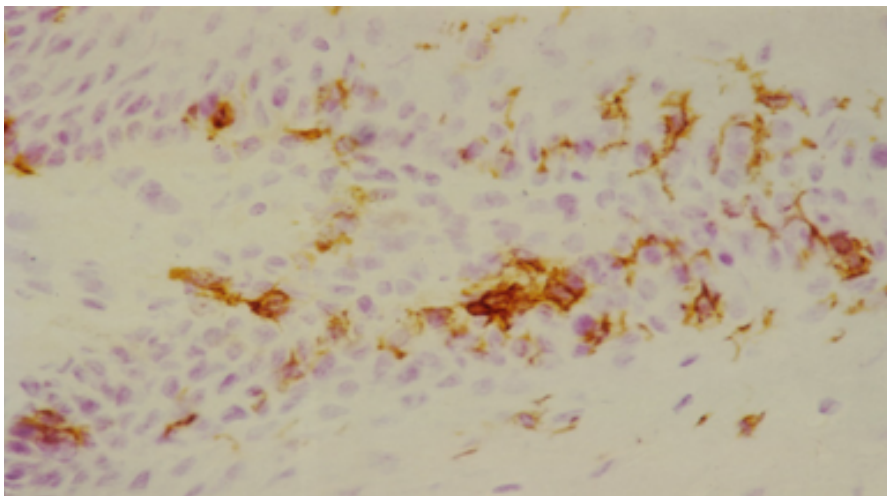


Fig. 20 - Imunocitoquímica anticorpos anti CD1a (T6); 400X. Mucosa oral humana. Observa-se marcação no citoplasma de células situadas entre os queratinócitos da camada espinhosa no epitélio pavimentoso estratificado da mucosa da boca.

Possuem núcleo de limites irregulares, originando por vezes formas nucleares complexas com multilobulações. A membrana nuclear encontra-se bem delineada devido à muita heterocromatina periférica (Fig. 21). Frequentemente observa-se um nucléolo vacuolar. O citoplasma destas células é abundante com numerosos prolongamentos finos e dendríticos. A identificação definitiva destas células é realizada pela observação dos grânulos de Bierbeck (Fig. 21, 22, 23). Estas estruturas têm uma forma típica de bastão rectilíneo, com membranas externas densas e uma linha estriada interna, apresentando por vezes uma extremidade dilatada (Fig.22). Os grânulos de Bierbeck encontram-se normalmente em aglomerados, nas proximidades do aparelho de Golgi e dos lisossomas (Fig. 23) e parecem relacionar-se com fenómenos de endocitose de partículas estranhas à célula, estando envolvidos no processamento de antígenos [125].



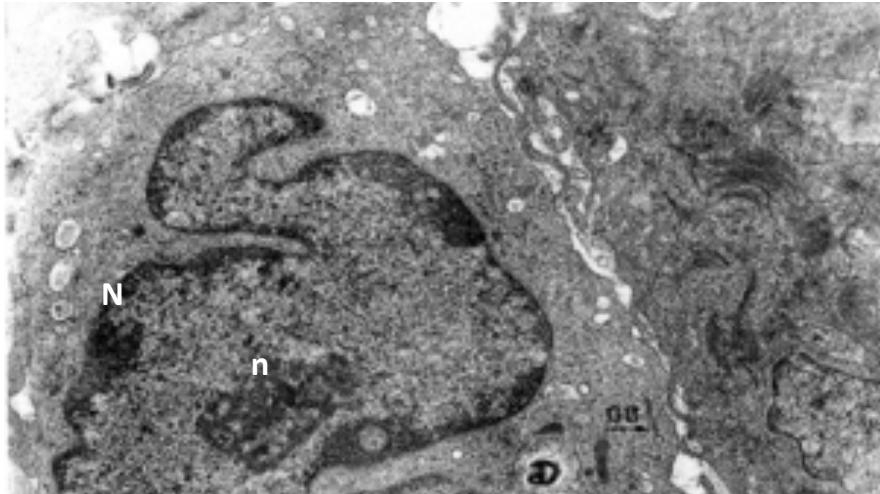


Fig. 21 - Microscopia electrónica de transmissão 6500X. Mucosa oral humana. Célula de Langerhans. Observa-se grânulo de Bierbeck no citoplasma (GB). Observa-se núcleo irregular típico (N) com heterocromatina junto da membrana nuclear e nucléolo vacuolar (n).

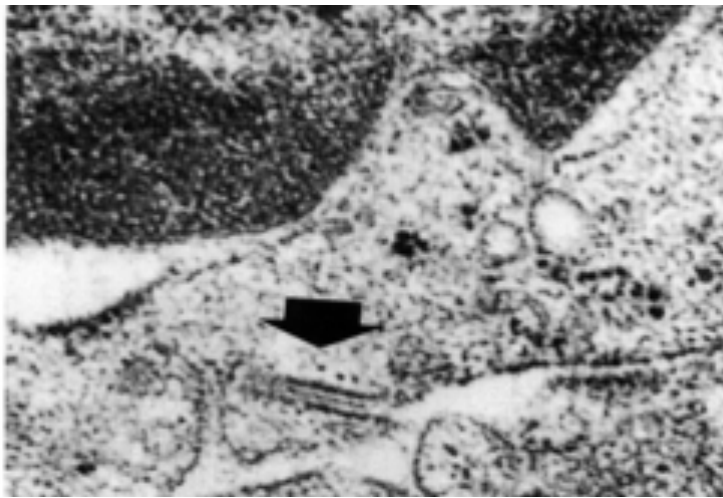


Fig. 22 - Microscopia electrónica de transmissão 8500X. Mucosa oral humana. Célula de Langerhans. Observa-se grande ampliação de grânulo de Bierbeck no citoplasma (seta).

As células de Langerhans possuem um citoplasma rico em ribossomas livres onde se encontram, também, algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e têm caracteristicamente um aparelho de Golgi muito desenvolvido (Fig. 23).

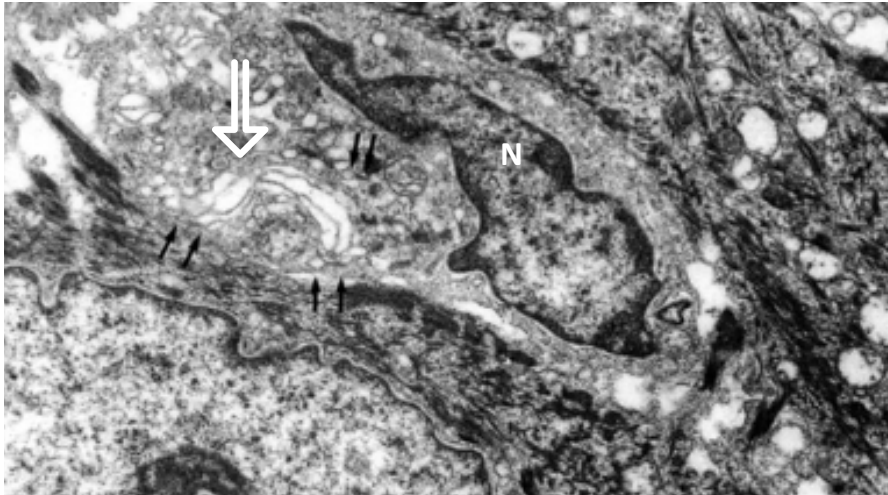


Fig. 23 - Microscopia electrónica de transmissão 6500X. Mucosa oral humana. Célula de Langerhans. Observa-se núcleo (N) com heterocromatina periférica abundante. No citoplasma identifica-se um aparelho de Golgi abundante (seta larga) e grânulos de Bierbeck (setas).

## MELANÓCITOS

Os melanócitos, encontram-se normalmente nas camadas basais do epitélio pavimentoso. O corpo celular, localiza-se junto da membrana basal e os seus prolongamentos observam-se a este nível ou mais apicais entre os queratinócitos (Fig. 24).

Os melanócitos derivam dos melanoblastos, que se originam embrionariamente nas cristas neurais. Le Dourin em 1982 e Ono *et al* em 1998, demonstraram esta origem e a sua migração posterior para diversos tecidos e órgãos [126].

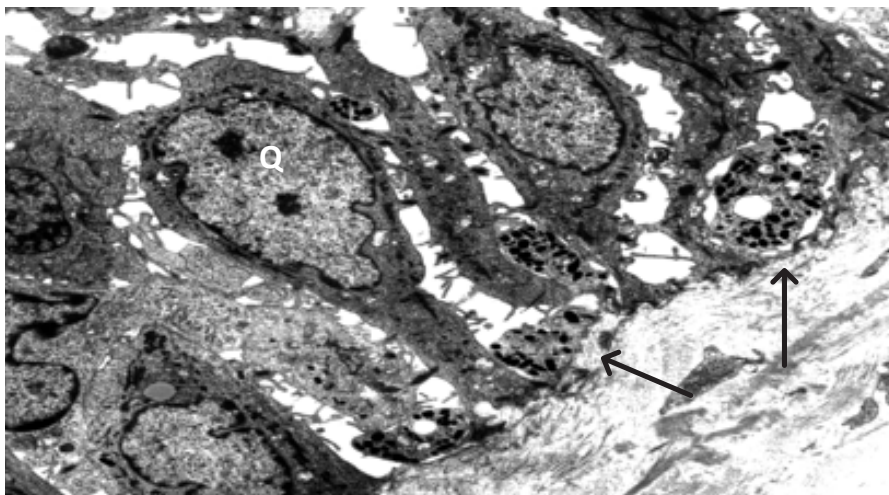


Fig. 24 - Microscopia electrónica de transmissão 2500X. Corda vocal humana. Camada basal do epitélio pavimentoso estratificado. Observam-se queratinócitos (Q) identificáveis pela citoqueratina do citoplasma e desmossomas da membrana citoplasmática. Notem-se dendritos de melanócitos com melanossomas no seu citoplasma junto à membrana apical (seta).

Os melanócitos estão descritos na mucosa da laringe, vaginal e esofágica, para além da mucosa oral (De Matos *et al* 1998). Desconhece-se qual o seu papel nestas mucosas, uma vez que elas não estão normalmente expostas à luz solar. E a principal função dos melanócitos é a protecção da radiação ultra violeta. Permanecem algumas dúvidas sobre a verdadeira justificação da sua existência na mucosa oral [127].

Os melanócitos possuem um núcleo que normalmente apresenta bastante heterocromatina periférica embora esta característica possa variar durante a vida da célula (Fig. 24). Estas células distinguem-se dos queratinócitos por não possuírem citoqueratina no citoplasma nem especializações da membrana citoplasmática (Fig.24).

Caracteristicamente contêm melanossomas, grânulos de forma esférica ou oval revestidos por uma membrana. São produzidos no aparelho de Golgi, que se encontra muito desenvolvido nestas células. A este organito chegam vesículas de transporte contendo tirosinase, enzima originária do retículo endoplasmático rugoso. Depois de acumulada no aparelho de Golgi, é incorporada nos melanossomas onde vai catalisar a transformação da tirosina em DOPA que se polimeriza, formando os precursores da melanina e posteriormente a melanina [126, 127].

Os melanossomas encontram-se em diferentes estádios de desenvolvimento. (Fig. 24,

25). Após a sua formação, os melanossomas migram na direcção dos dendritos e no interior destes em sentido centrífugo. Nas extremidades dos dendritos encontram-se naturalmente os melanossomas mais maduros (Fig. 25) [127].

A comprovação da síntese de melanina foi possível pela marcação radioactiva de precursores da melanina. Em 1980, Seiji conseguiu demonstrar estes factos com técnicas de auto-radiografia ultraestrutural [128].

Cada melanócito relaciona-se com os queratinócitos adjacentes numa relação de cerca de 1:10. Esta associação morfofuncional chama-se unidade epitélio-melânica. Os melanossomas com a melanização completa são transferidos para os queratinócitos vizinhos, sendo a incorporação dos melanossomas pelos queratinócitos feita por um mecanismo de fagocitose denominado citocrinia (Fig. 24) [128].

A melanina depois de dispersada por processos metabólicos intra celulares, é eliminada pelas camadas superficiais do epitélio (Fig. 25). No entanto, na mucosa oral a melanina encontra-se praticamente apenas ao nível das células próximas aos melanócitos. A explicação poderá estar relacionada com a falta de exposição da mucosa à radiação ultravioleta da luz solar [128].

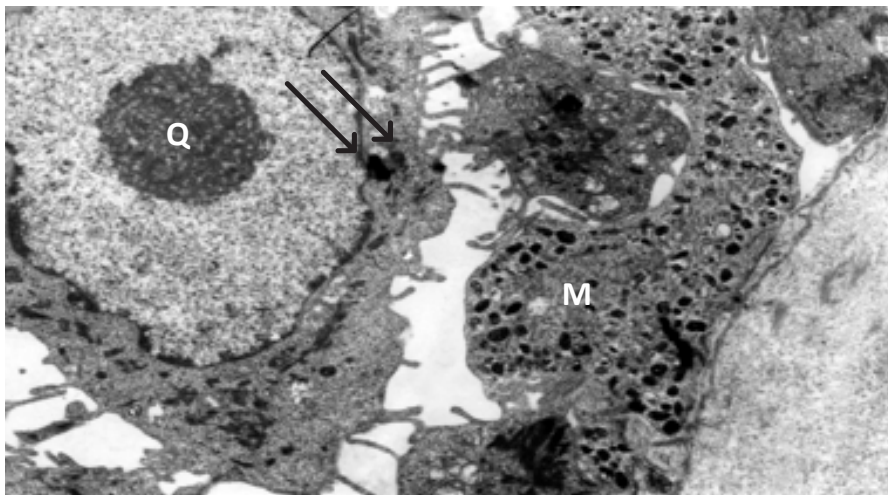


Fig. 25 - Microscopia electrónica de transmissão 8500X. Corda vocal humana. Maior ampliação dos aspectos da figura anterior permitindo observar no citoplasma do queratinócito adjacente (Q) a um melanócito (M), um melanossoma (setas).



A taxa de transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos parece ser também inferior à que acontece na epiderme.

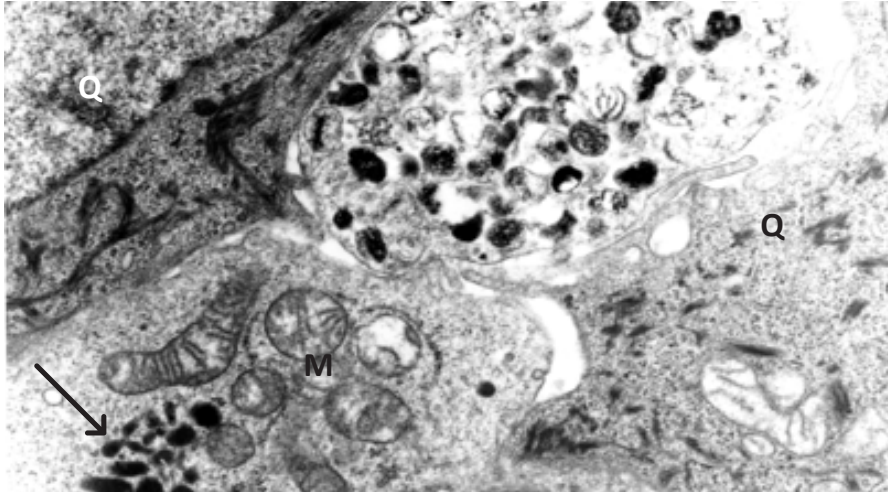


Fig. 26 - Microscopia electrónica de transmissão 12000X. Corda vocal humana. Observam-se dois dendritos de melanócitos entre dois queratinócitos (Q). Destacam-se no dendrito da esquerda uma grande riqueza de mitocôndrias (M) o que a par de melanossomas tipo IV, maduros (seta), sugere tratar-se da região distal de um dendrito. O outro dendrito apresenta melanossomas mais imaturos.

## CÉLULAS MIGRANTES

Para além das células residentes, os epitélios pavimentosos estratificados possuem igualmente células migrantes. Estas células migram do tecido conjuntivo subjacente da lâmina própria, atravessam a membrana basal, e insinuam-se entre os queratinócitos das várias camadas epiteliais (Fig. 27, 28). Os linfócitos foram os mais observados (Fig. 29), sendo mais raros os polimorfonucleados e, ainda mais, as células da série monocítica. De entre os polimorfonucleados, os mais comuns são os neutrófilos (Fig. 30). Em situações de doença, nomeadamente na patologia inflamatória, o número destas células chega a ser elevado e encontram-se em abundância nas camadas superficiais, sendo fáceis de observar com endoscopia de contacto.

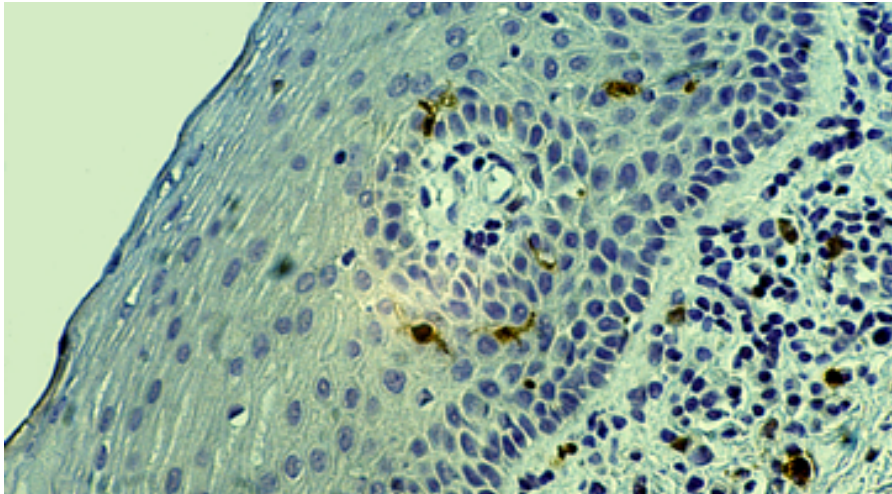


Fig. 27 - Microscopia óptica 2500X. Corda vocal humana. Imunocitoquímica anticorpo anti – LCA (*leucocyte common antigen*). Observam-se células inflamatórias marcadas no epitélio e no tecido conjuntivo da lâmina própria.

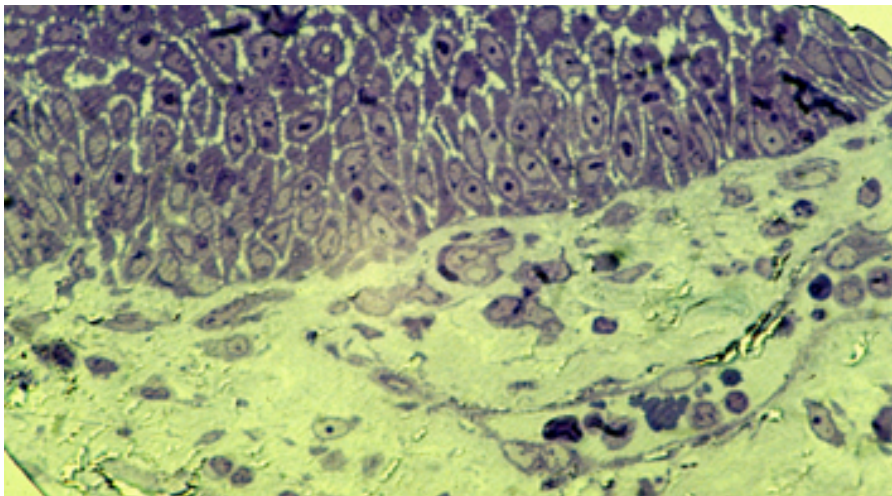


Fig. 28 - Microscopia óptica 250X corte semi-fino. Corda vocal humana. Corado com Azul de toluidina. Identifica-se um vaso sanguíneo com leucócitos no seu interior que migram por diapedese para o conjuntivo; posteriormente algumas dessas células acabam por transpor a membrana basal e chegam ao epitélio.

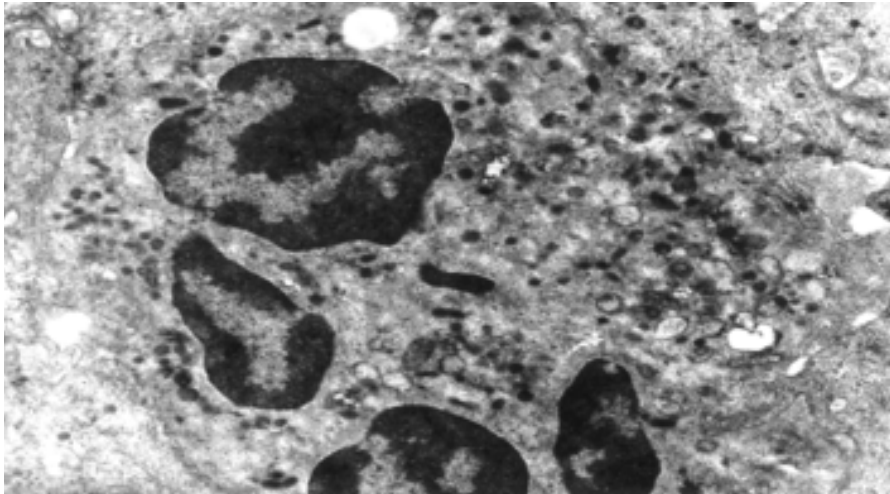


Fig. 29 - Microscopia electrónica 7000X. Corda vocal humana. Neutrófilo das camadas intermédias do epitélio pavimentoso com o seu núcleo polilobulado típico. Observam-se os grânulos citoplasmáticos tipicamente de pequenas dimensões.

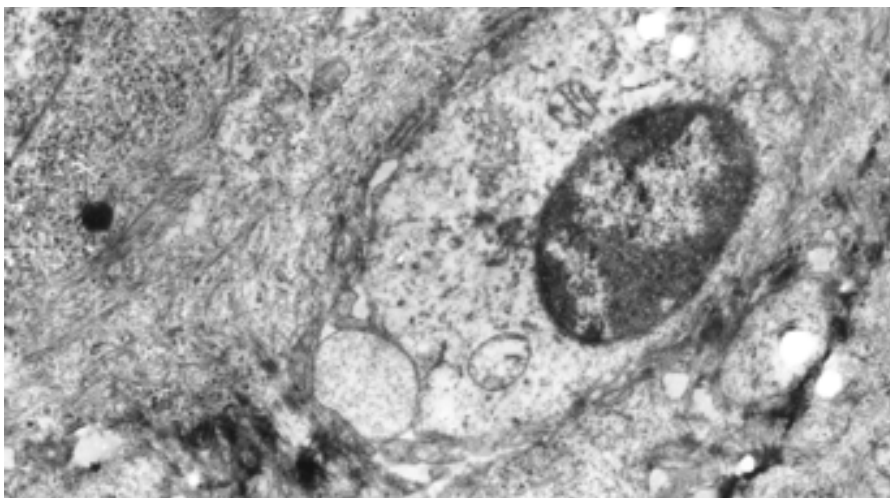


Fig. 30 - Microscopia electrónica 6000X. Corda vocal humana. Linfócitos das camadas intermédias do epitélio pavimentoso com o seu núcleo oval típico. Observa-se citoplasma tipicamente agranulocítico.

## EPITÉLIO GLANDULAR

Para além do epitélio de revestimento, a cavidade oral possui um epitélio glandular. A endoscopia de contacto permite observar *os ostia* dos canais excretores destas glândulas.

As glândulas da cavidade bucal são acinares, constituídas por ácinos serosos, mucosos e mistos. São glândulas do tipo simples ramificado em que o canal excretor resulta da confluência de múltiplos canalículos provenientes dos múltiplos ácinos.

## SISTEMA CANALICULAR

O sistema excretor destas glândulas exócrinas é constituído por diversos tipos de canais que dos ácinos para a superfície se dividem em de três tipos: canais intercalares, canais estriados e finalmente os canais excretores.

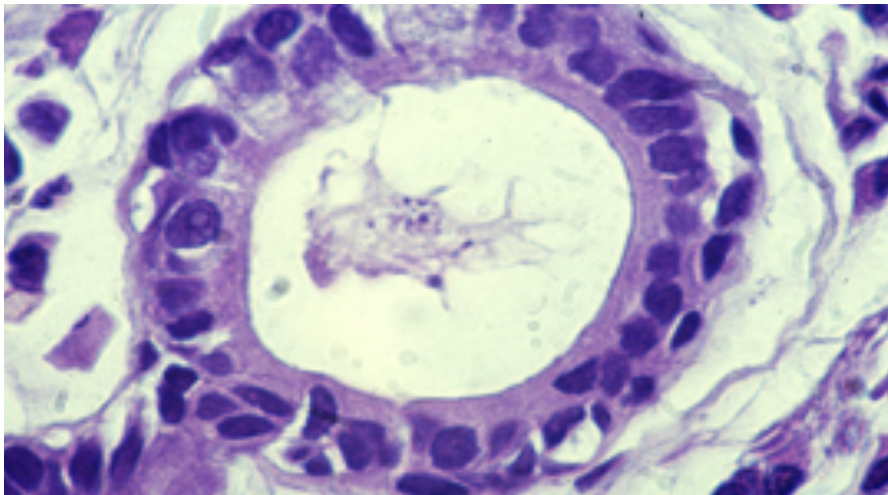


Fig. 31 - Microscopia óptica Hematoxilina-eosina 400X. Corda vocal humana. Observa-se um epitélio cubico simples, devido ao corte, algumas áreas já envolvem a transição deste canal para o tipo canal estriado.



## CANAIS INTERCALARES

Os canais intercalares são curtos e constituídos por um epitélio cúbico simples (Fig.30). A função deste epitélio é sobretudo de suporte estrutural, não parecendo ter capacidade de transporte de iões significativa, ao contrário das células dos canais estriados, mas também das dos canais excretores, que têm capacidade de realizar transporte de iões entre o lúmen e o espaço intersticial, nomeadamente, reabsorver através de transporte activo, sódio e outros electrólitos, tornando a secreção hipotónica.

## CANAIS ESTRIADOS

Os canais estriados possuem um epitélio simples prismático (Fig. 32), constituído por três tipos de células: as células claras, as mais abundantes, as células escuras e as células basais (Almeida 2001). A classificação destas células faz-se com base na sua morfologia e na distribuição da citoqueratina (Fig. 32, 33. 34).

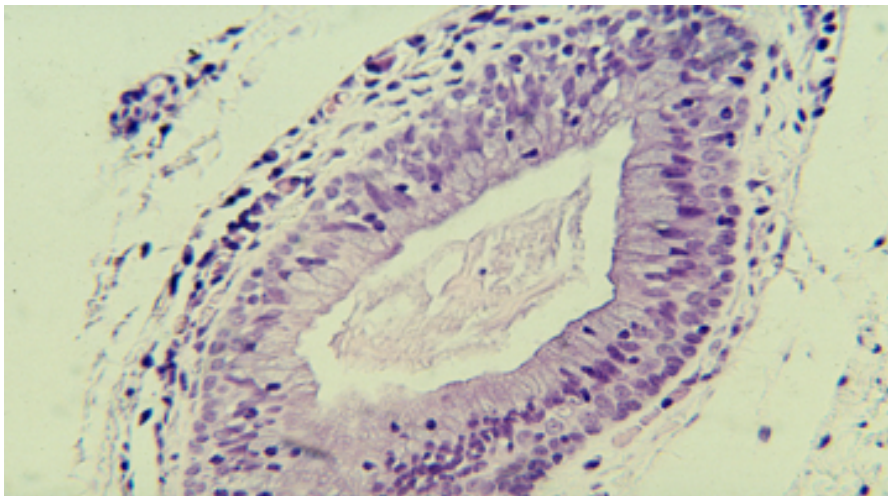


Fig. 32 - Microscopia óptica Hematoxilina-eosina 250X. Corda vocal humana. Observa-se um canal estriado revestido por epitélio prismático simples.

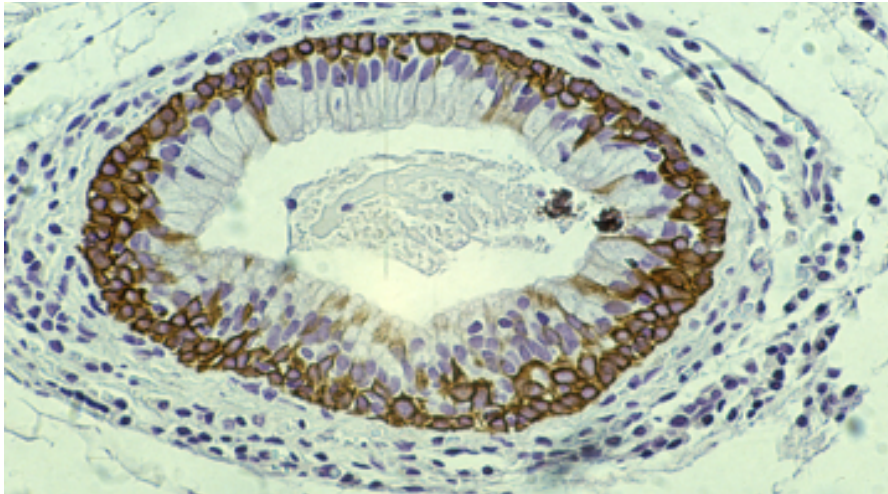


Fig. 33 - Microscopia óptica imunocitoquímica anticorpo anti 34  $\beta$ E12 250X. Corda vocal humana. Observa-se um corte transversal de um canal estriado revestido por epitélio prismático simples. Com esta marcação conseguimos distinguir os três tipos de células.

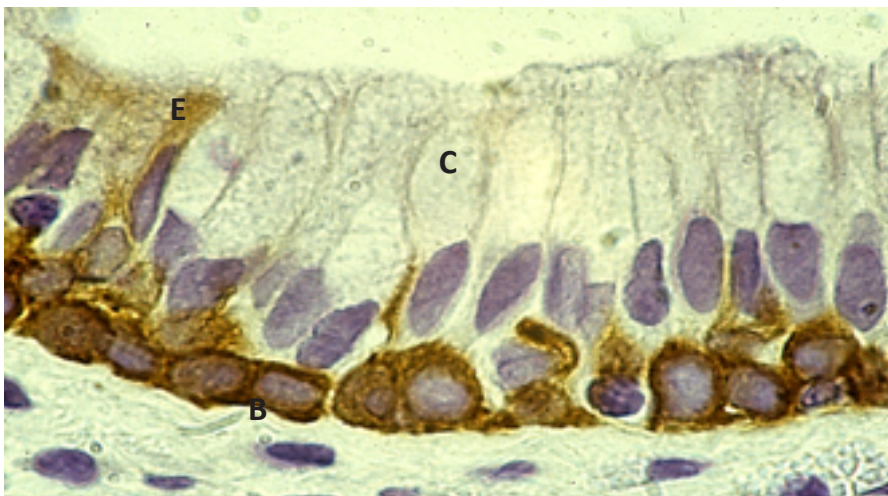


Fig. 34 - Microscopia óptica imunocitoquímica anticorpo anti 34  $\beta$ E12 1000X. Corda vocal humana. Observa-se um corte transversal de um canal estriado revestido por epitélio prismático simples. Com esta marcação conseguimos distinguir os três tipos de células. As células claras (C), as células basais (B) e as células escuras (E).

## CANAIS EXCRETORES

Tendo os canais excretores o mesmo tipo de epitélio que a superfície epitelial, é difícil perceber onde acaba o epitélio glandular e começa o epitélio de revestimento. Esta é a área que podemos observar com endoscopia de contacto. Nas imagens das fig. 35 e 36 podemos observar e distinguir os dois tipos de epitélio através da marcação imunocitoquímica, com anticorpos anti citoqueratina de baixo peso molecular típico do epitélio glandular, que não marca o epitélio de revestimento, e com anticorpos anti citoqueratina de alto peso molecular que marca ambos os tipos de epitélio.

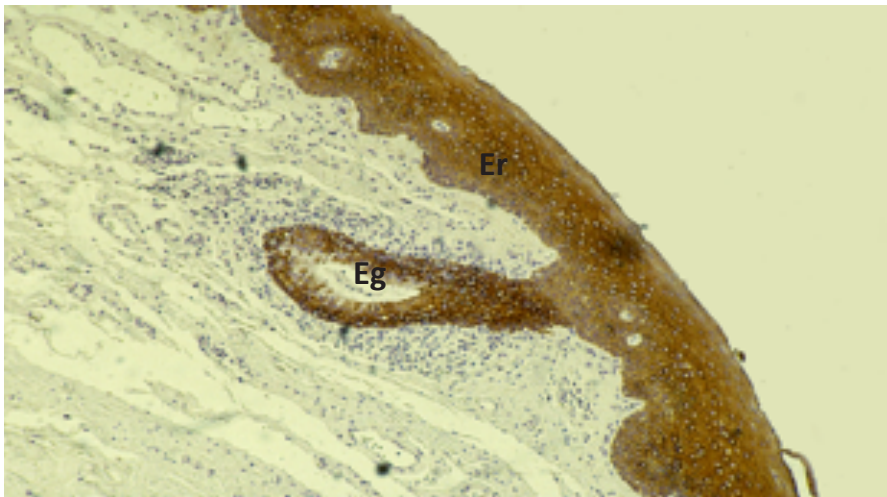


Fig. 35 - Microscopia óptica Imunocitoquímica 35 $\beta$ E11 120X. Corda vocal humana. Observa-se epitélio de revestimento (Er) e epitélio glandular (Eg) marcados com anticorpo anti citoqueratina de alto peso molecular.

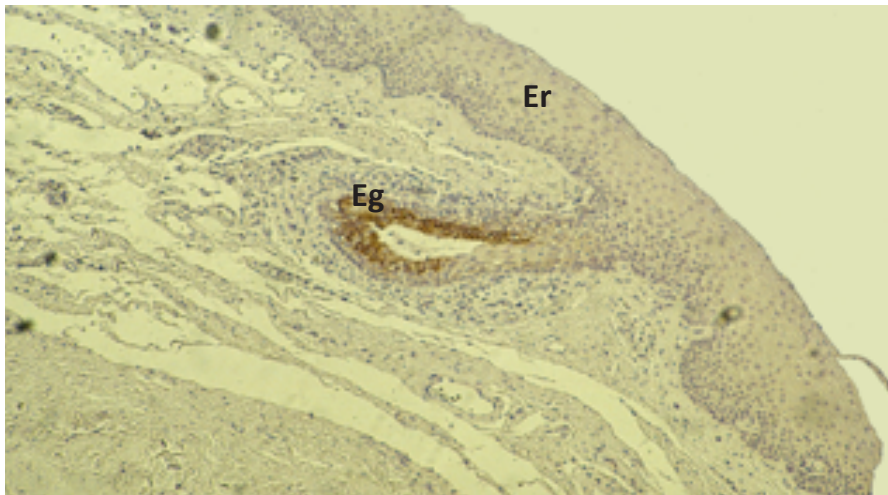


Fig. 36 - Microscopia óptica Imuno-citoquímica 35 $\beta$ E12 120X. Corda vocal humana. Observa-se epitélio de revestimento (Er) não marcado com o anticorpo anti citoqueratina de baixo peso molecular que só marca o epitélio glandular (Eg).

## TECIDO CONJUNTIVO

O tecido conjuntivo distingue-se do tecido epitelial por ter origem embrionária diferente, na mesoderme, e por ter características morfológicas quase diametralmente opostas. Tem as suas células afastadas e separadas por matriz extracelular abundante. Esta matriz é composta por substância intersticial e um componente microfibrilar e fibrilar, nomeadamente colagénio e fibras elásticas (Fig. 37).

Ao contrário do epitélio é um tecido vascularizado e innervado. Tem várias funções, entre as quais se destacam: o suporte mecânico, a ancoragem, a reserva nutricional, o transporte, a defesa, a reparação e o isolamento, entre outras mais ou menos específicas.



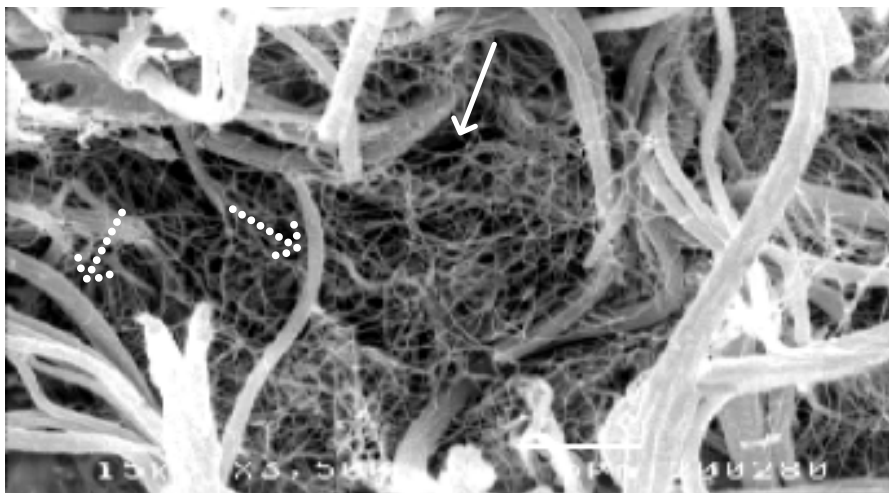


Fig. 37 - Microscopia electrónica de varrimento. Corda vocal humana. Plano paralelo à superfície. Orientação do conjuntivo para a membrana basal. Observam-se microfibrilhas da lâmina basal (seta). Num plano mais profundo observam-se fibrilhas de colagénio e elásticas (seta descontinua).

O tipo de células mais abundante no tecido conjuntivo é o fibroblasto (Fig. 38). Os fibroblastos jovens, metabolicamente activos, produzem e libertam por exocitose a substância amorfa intersticial e as fibras (Fig. 39).



Fig. 38 - Microscopia electrónica de transmissão 3000X. Corda vocal humana. Fibroblasto. Provável célula jovem, metabolicamente activa; observa-se aparelho endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi abundante no citoplasma.

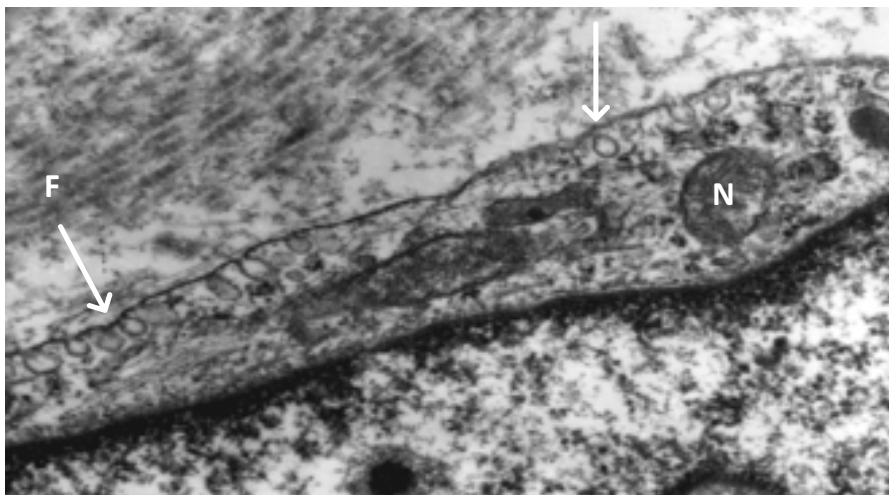


Fig. 39 - Microscopia electrónica de transmissão 8000X. Corda vocal humana. Num ambiente de conjuntivo onde se identificam múltiplas fibras (F) observa-se parcialmente um fibroblasto podendo visualizar-se vesículas de exocitose na sua membrana citoplasmática (setas). O núcleo (N) para além da heterocromatina periférica possui bastante eucromatina sugerindo grande actividade metabólica de síntese.

A camada superficial da lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo laxo. Tem muitas vezes uma configuração de papilas que se insinuam nas papilas do epitélio (Fig. 1). Em profundidade, na lâmina própria no sentido apical-basal, encontramos o tecido conjuntivo denso mais rico em fibras, renovável pela capacidade mitótica das suas células e pela capacidade destas células produzirem a matriz extracelular.

CAPÍTULO 2

# MATERIAL E MÉTODOS



# MATERIAL E MÉTODOS

## POPULAÇÃO

Foi realizado um estudo transversal analítico, após consentimento da Comissão de Ética, com uma amostra constituída por todas as lesões da mucosa oral observadas na consulta de Otorrinolaringologia de Patologia Oral do Hospital de Beatriz Ângelo, entre 2012 - 2016 (n-148). Esta consulta é uma consulta multidisciplinar, que engloba médicos de Otorrinolaringologia do Hospital Beatriz Ângelo e médicos do Hospital de Santa Maria/Centro Hospitalar Lisboa Norte de Medicina Oral e Estomatologia e de Dermatologia.

O critério de inclusão no estudo foi de apresentar todas as lesões da cavidade oral, que persistissem por um período superior a 3 semanas apesar de sujeitas a tratamento, e que realizaram observação por endoscopia de contacto. Foram excluídos os doentes com diagnóstico histológico já conhecido e/ou quando não se justificava a realização de biopsia diagnóstica ou excisional.

## MÉTODOS

O diagnóstico clínico foi realizado por clínicos independentes, das especialidades de Otorrinolaringologia, Medicina Oral / Estomatologia ou Dermatologia e baseado na história clínica e na observação clássica macroscópica. As lesões foram classificadas em dois grandes grupos – as benignas e as malignas – tendo sido englobadas no grupo das benignas as consideradas clinicamente potencialmente malignas. Foram consideradas como potencialmente malignas, as leucoplasias, as eritroleucoplasias e os líquenes e como clinicamente malignas, as lesões exofíticas, ulceradas, infiltradas e algumas leucoplasias e eritroleucoplasias que à observação se apresentassem mais irregulares, mais friáveis, mais endurecidas ou infiltradas à palpação e, por isso, mais suspeitas de poderem ser de natureza maligna. As imagens foram interpretadas durante o procedimento e os dados foram recolhidos para a base de dados. Gravaram-se algumas das sequências de vídeo mais representativas bem como algumas fotografias mais exemplificativas.

Todos estes doentes realizaram o procedimento protocolado para esta consulta multidisciplinar, começando por uma anamnese, seguida de observação clínica clássica, complementada com exame por endoscopia de contacto após consentimento informado. Depois da formulação de hipóteses diagnósticas, realizou-se uma biópsia (incisional ou excisional) para estudo histológico com vista ao diagnóstico definitivo. A localização desta biópsia foi decidida por critérios clínicos de suspeição, eventualmente complementada por detecção de área suspeita por endoscopia de contacto. Nunca se deixou de biopsar uma área clinicamente suspeita.

O anatomopatologista recebeu o mesmo diagnóstico clínico que o Otorrinolaringologista que executou a endoscopia de contacto, não tendo, no entanto, acesso a qualquer informação dada pela endoscopia de contacto. O diagnóstico histopatológico foi considerado o teste padrão do estudo.

A endoscopia de contacto veio permitir o estudo de algumas características histológicas e citológicas *in vivo*, sem necessidade de retirar as células do seu meio natural para serem estudadas (biópsia). Esta possibilidade permite ter acesso, em tempo útil e de forma directa, às células do epitélio das mucosas, aos *ostia* glandulares e à microcirculação subepitelial. O conceito inerente a esta observação é completamente distinto da observação morfológica clássica em histologia e em microscopia electrónica de transmissão e varrimento pois as células, as glândulas e os vasos são observados no seu ambiente natural, interferindo pouco com a normal fisiologia destas estruturas e produzindo menos artefactos do que qualquer um dos métodos clássicos. Permite ainda ter acesso a alguns aspectos dinâmicos, como a cinética dos glóbulos vermelhos na circulação sanguínea e a excreção para a superfície da produção glandular através dos ostia glandulares. O facto de obtermos informação distinta, não tão completa em alguns domínios, mas mais abrangente em outros, sugere como objectivo, não a substituição das técnicas clássicas pela endoscopia de contacto, mas a sua intercomplementaridade.

As variáveis consideradas para definir os padrões de benignidade e malignidade foram subdivididos em dois grupos: o padrão celular e o padrão vascular. Em relação ao padrão celular considerámos as seguintes variáveis [3]:

**Heterogeneidade celular.** Avaliou-se a homogeneidade Vs heterogeneidade. Definimos como um campo de observação homogéneo aquele em que, quando o subdividimos imaginariamente em quatro quadrantes de dimensões iguais, se obtêm individualmente quatro imagens semelhante entre si e a imagem geral. Se mudarmos de localização aleatoriamente, não se altera significativamente o aspecto geral.

**Forma alterada das células.** Avaliou-se a forma regular Vs irregular dos núcleos das células. Considerou-se que os núcleos possuem forma irregular quando esta diverge da forma típica do núcleo das células da região em observação e quando existem, no mesmo campo óptico, núcleos com dimensões e formas diversas.

**Razão núcleo/citoplasma irregular.** Tendo em conta as dimensões relativas do núcleo e do citoplasma da respectiva célula, considerou-se irregular quando, no mesmo campo óptico, observámos rácios diferentes. Em algumas regiões o limite citoplasmático da célula é difícil de detectar; nessas situações foi considerada a densidade nuclear por área ou a distância internuclear, como o equivalente da razão núcleo/citoplasma.

**Intensidade da coloração nuclear regular/irregular.** Foi a variável mais difícil de caracterizar por ser mais subjectiva, facto que foi considerado na avaliação dos resultados.

**Observação de nucléolos.**

**Observação de mitoses.**

**Células sem núcleo (hiperqueratose) heterogéneo.** Avaliou-se as hiperqueratoses regulares ou homogéneas Vs hiperqueratose heterogéneas ou irregulares. Considerámos hiperqueratose homogénea quando se observam escamas celulares bem delimitadas dispostas de forma ordenada simulando um pavimento de mosaicos. Em oposição, considerou-se hiperqueratose heterogénea quando se observam escamas mal delimitadas e de tamanho e forma variáveis ou apenas com um aspecto amorfo, sem delimitação de escamas celulares.

As variáveis utilizadas para definir os padrões vasculares foram as seguintes:

**Arquitectura vascular irregular e desorganizada.** Avaliou-se a arquitectura harmoniosa e regular Vs arquitectura desorganizada, irregular e caótica. Considerou-se harmoniosa a arquitectura constituída por vasos com forma e dimensões típicas e que apresentava, no seu conjunto, uma distribuição com a mesma orientação e densidade por área.

**Vasos com forma alterada.** Considerou-se que os vasos têm forma alterada quando apresentam uma forma diferente da típica da região ou quando se observam vasos com formas complexas, normalmente não reprodutíveis no mesmo campo óptico, ou ainda casos com distorções difíceis de caracterizar ou descrever como alguma forma específica.

**Observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos.** Excluíram-se hemorragias com sangue no campo de observação. Considerou-se os glóbulos vermelhos observados em pequenos grupos fora do trajecto dos vasos.

**Observação de microtrombozes.** Correspondem a alargamentos nodulares dos vasos, formados aparentemente pela acumulação localizada de eritrócitos, com implicações no normal fluxo da circulação sanguínea. Considerou-se esta denominação apesar de poder não ser muito correcta fisiopatologicamente.

Foram observados com endoscopia de contacto para definição do padrão normal, dez indivíduos voluntários não fumadores, sem hábitos alcoólicos, sem lesões macroscópicas aparentes ou qualquer queixa clínica, que serviram como referência para a definição do padrão normal. Durante as observações dos doentes, a área da mucosa contra lateral, quando livre de lesão, serviu igualmente como referência da normalidade.

## EXECUÇÃO DA TÉCNICA

A endoscopia de contacto é uma técnica que necessita de um instrumental muito reduzido para a sua execução, qualquer que seja o território a observar. O equipamento imprescindível para a sua realização é constituído apenas por uma fonte de luz fria, um endoscópio de contacto e azul de metileno [3].

A fonte de luz fria não tem nenhuma especificidade, não necessita de qualquer filtro de luz ou potência especial. Pode ser usada qualquer uma das fontes de luz de endoscopia utilizada na consulta ou no bloco operatório de qualquer serviço de Otorrinolaringologia [3].

O endoscópio de contacto é o único elemento não disponível em todos os serviços de Otorrinolaringologia (Fig. 1). Apesar de ser específico para observações a nível celular, pode ser usado como um endoscópio comum. Existem 4 endoscópios de contacto comercializados e todos eles podem ser utilizados para observar a cavidade oral. Dois desses endoscópios têm 23 cm de comprimento e 5,5 mm de diâmetro com uma angulação de 0º e 30º. Os outros dois têm 18 cm de comprimento com 4 mm de diâmetro com uma angulação de 0º e 30º. No nosso estudo foi utilizado o endoscópio de 23 cm com angulação de 0º. O endoscópio possui um botão de focagem (Fig.2) que permite regular para visão macroscópica, funcionando como um endoscópio comum, ou regular para visão microscópica para 60 ou 150 aumentos. Permite ainda focagem em diversos níveis de observação (Fig. 1, 2).





Fig. 1 - Endoscópio de contacto Karl Storz. 23 cm de comprimento 5,5 mm de diâmetro.

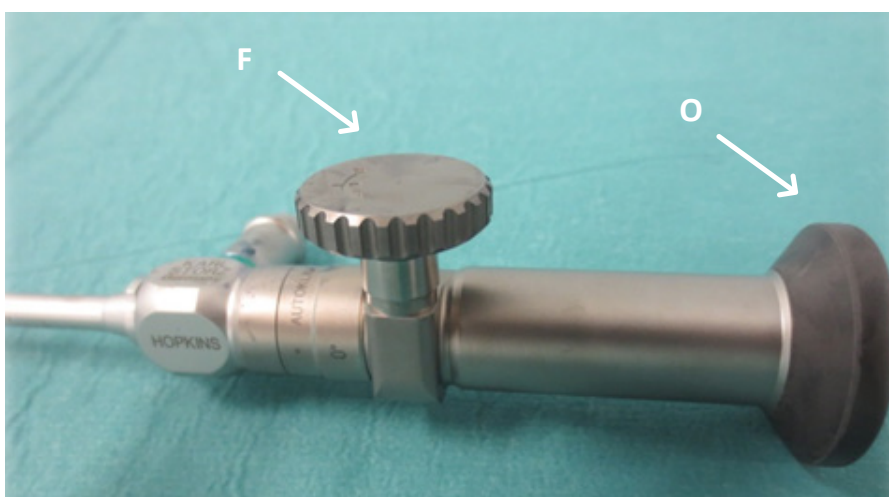


Fig. 2 - Pormenor do endoscópio de contacto. Observa-se a ocular (O); o botão de focagem (F) que permite focar para observação macroscópica ou microscópica e variar a ampliação de 60X para 150X.

O terceiro elemento imprescindível é o azul de metileno a 1%, um corante vital que é usado para garantir o contraste, capaz de diferenciar o núcleo e o citoplasma das células do epitélio. Para aplicar o azul de metileno sobre a área da mucosa a observar, utilizamos um pequeno fragmento de esponja absorvível de gelatina (spongostan®), um pequeno bico de gaze ou uma bola de algodão, embebidos no corante.

O quarto elemento é constituído pelo sistema de imagem, que não é indispensável. São usadas câmara de vídeo, monitor e gravador de imagem, ainda que não sejam imprescindíveis à realização do procedimento e ao estabelecimento de uma hipótese diagnóstica. A observação pode ser ocular através do endoscópio.

No domínio da Otorrinolaringologia, a observação por endoscopia de contacto de áreas como a mucosa oral, nasal e a rinofaringe, não necessita de qualquer tipo de anestesia, podendo a técnica ser realizada durante a consulta de forma rápida e indolor. A observação pode ser repetida sempre que necessário, sem causar qualquer incómodo para o doente. A avaliação da laringe, da hipofaringe e, normalmente, da orofaringe implicam a realização de anestesia geral, devido à natural falta de tolerância do doente para o acesso e toque do endoscópio na superfície destas regiões.

Os acidentes com esta técnica são raros e, quando acontecem, são de pouca importância. No entanto, principalmente em áreas de mucosa mais frágil, como a face ventral da língua e o pavimento da boca, uma intensidade de luz muito forte associada à observação estática no mesmo ponto durante um período prolongado, pode provocar pequenos traumatismos térmicos, que podem prejudicar a observação e dos quais podem resultar pequenas aftas. Apesar de raros, estes episódios podem ser evitados regulando a intensidade da fonte de luz para o mínimo, com ajuste progressivo durante o procedimento, até obter uma imagem microscópica com boa resolução e menor intensidade de luz. Devem evitar-se, igualmente, observações estáticas e demoradas sobre o mesmo ponto e o endoscópio deve realizar movimentos de varredura intercalado com breves paragens para observação de detalhes.

A observação não provoca, normalmente, qualquer desconforto no doente. No entanto, a observação de lesões ulceradas pode ser dolorosa. Estas lesões têm um componente álgico típico e a pressão física da ponta do endoscópio sobre a úlcera desencadeia facilmente dor. Devemos ser o mais céleres possível e tentar começar a observação na área adjacente da lesão, avançando em seguida para os limites da úlcera, evitando o leito da lesão, uma vez que, por definição, não possui epitélio.

A execução da técnica começa com a observação macroscópica da mucosa com o endoscópio de contacto. Nesta fase, a ponta do endoscópio não toca a mucosa, funcionando como um endoscópio comum. A focagem é feita com o botão de foco. Quando detectamos uma área que queremos observar microscopicamente, diminuimos a intensidade da fonte de luz, para evitar lesões térmicas da mucosa, encostamos a ponta do endoscópio à superfície exercendo uma pressão muito ligeira, e focamos para 60 aumentos de ampliação através

da regulação do botão de focagem. O primeiro ponto de foco é sub epitelial para observar a microcirculação (foto 3). As células não possuem contraste natural, são transparentes e, portanto, não são detectadas pela técnica sem coloração prévia.

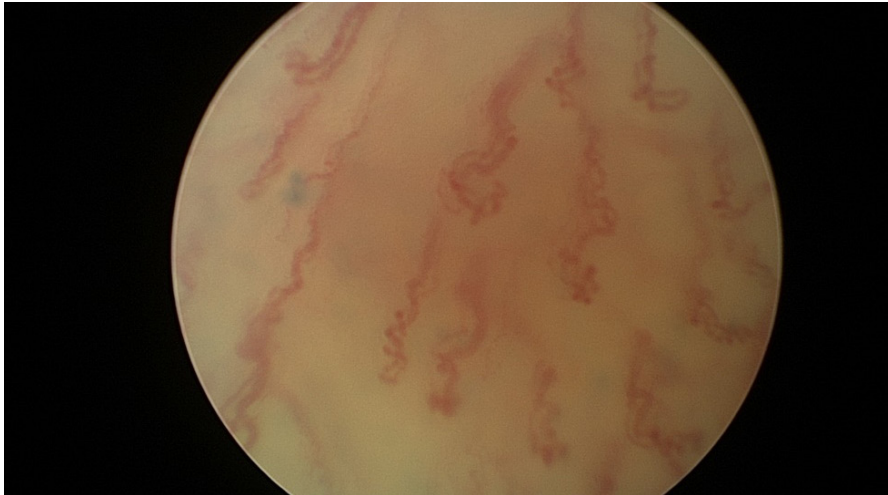


Fig. 3 - Endoscopia de contacto 60X. Vasos normais do palato mole observados sem qualquer coloração. A hemoglobina das células da série vermelha funciona como corante natural para observação dos vasos. A forma dos vasos é observada não por visualização das suas paredes mas por observação dos glóbulos vermelhos que os preenchem de forma dinâmica.

A fase seguinte consiste em corar a área a observar com azul de metileno a 1%, voltar a encostar a ponta do endoscópio e focar então para o plano celular, mais superficial do que o vascular (Fig. 4). Antes da coloração com azul de metileno, é necessário remover o excesso de saliva sobre a mucosa. Esta impede a fixação do corante vital, acelera a auto lavagem e a remoção do corante e dificulta a focagem. A remoção do excesso de secreção deverá ser realizada com gaze ou esponja de gelatina (spongostan®), sem esfregar, ou com aspiração indirecta com intensidade regulada.

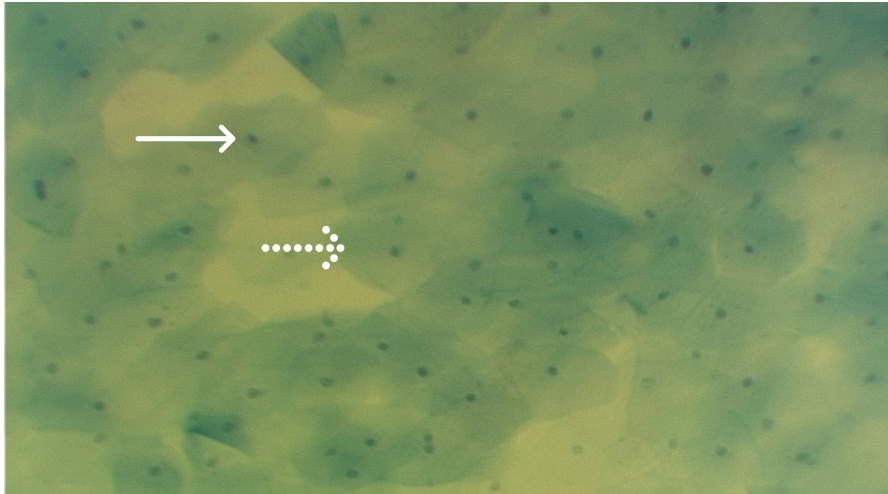


Fig. 4 - Endoscopia de contacto 60X com zoom. Padrão celular normal da mucosa jugal. Células coradas com azul de metileno. Núcleo corado de azul escuro (seta) e citoplasma corado de azul claro (seta descontinua).

Se regularmos a focagem para um plano um pouco mais profundo, temos igualmente acesso à microcirculação sub-epitelial (Fig.5). Existe um ponto de focagem intermédio que permite observar em simultâneo células e vasos, com um grau de definição muito aceitável (Fig. 6).

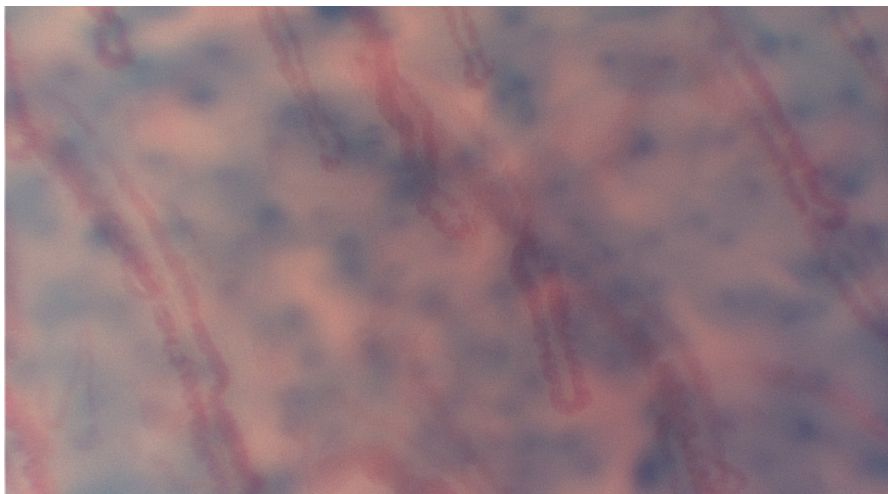


Fig. 5 - Endoscopia de contacto 60X com zoom. Mucosa jugal. Vasos observados com coloração de azul de metileno. Os vasos são corados naturalmente pela hemoglobina dos glóbulos vermelhos, mas o azul de metileno cora as células epiteliais, aumentando o contraste e a resolução da imagem dos vasos.

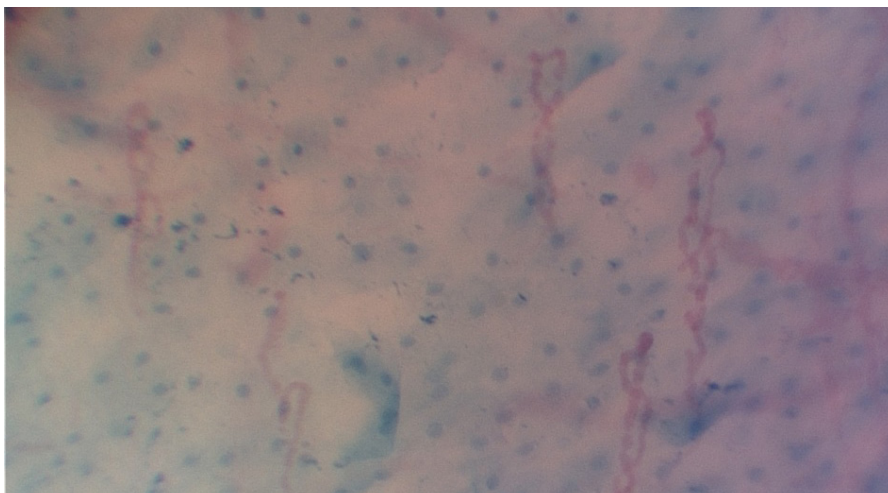


Fig. 6 - Endoscopia de contacto 60X com zoom. Focagem para plano intermédio. Células e microvascularização subepitelial. Padrão normal da mucosa jugal.

Após estar no plano de focagem desejado, a ponta do endoscópio percorre toda a área que queremos estudar. Começamos por observar uma área adjacente macroscopicamente normal que pode servir, na prática, como referência padrão de normalidade do próprio doente. Em seguida, dirigimos a observação na direcção da lesão movendo a ponta do endoscópio nesse sentido, proporcionando a captação de imagens microscópicas destes territórios. A endoscopia de contacto é uma técnica dinâmica embora pontualmente se realizem observações com o endoscópio estático. Normalmente este está em movimento constante o que permite cobrir rapidamente uma grande área. Devido às grandes ampliações utilizadas, a imagem de vídeo é de melhor qualidade do que a imagem da fotografia, que facilmente fica desfocada.

Quando se observa algum aspecto que julgamos merecer uma observação mais detalhada podemos aumentar o zoom da câmara ou trocar a ampliação para 150 aumentos (Fig. 7), observar e retornar à ampliação de base.

A observação com 150 aumentos necessita de mais luz e de uma maior estabilização da ponta do endoscópio, podendo ser impossível realizar com êxito em algumas situações. Nestes casos a observação é mais fácil sem câmara; a observação directa através da ocular pode ser mais eficaz se a intensidade da luz não for suficiente para conseguir uma boa imagem com o sistema de vídeo. Outra opção, quando não conseguimos uma boa definição da imagem, é a observação com 60 aumentos em que vamos aumentando o zoom da câmara até uma ampliação em que a luz permita uma boa resolução.



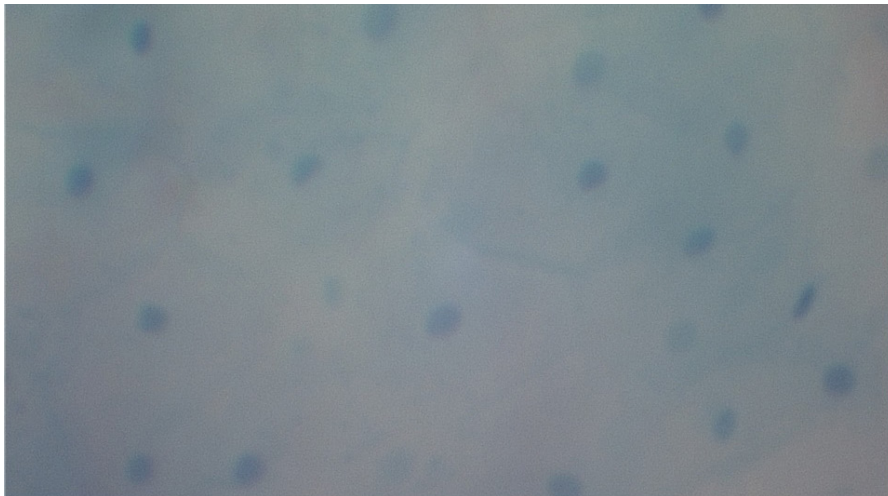


Fig. 7 - Endoscopia de contacto 150X. Mucosa jugal corada com azul de metileno. Padrão normal.

O movimento da ponta do endoscópio ao longo da superfície provoca, frequentemente, alguns artefactos que devem ser detectados como tal, evitando descrições e diagnósticos erróneos. O mais significativo é o enrolamento de algumas células epiteliais da camada superficial, formando estruturas filamentosas que podem ser facilmente confundidas com hifas fúngicas (Fig 8). Em alguns casos, as células dobras isoladamente e nesses casos o artefacto é mais facilmente identificado, não induzindo em diagnósticos erróneos (Fig 8). As células também podem sofrer descamação, formando espaços não corados com forma poliédrica, sobreponível à forma da célula aí existente (Fig. 8).

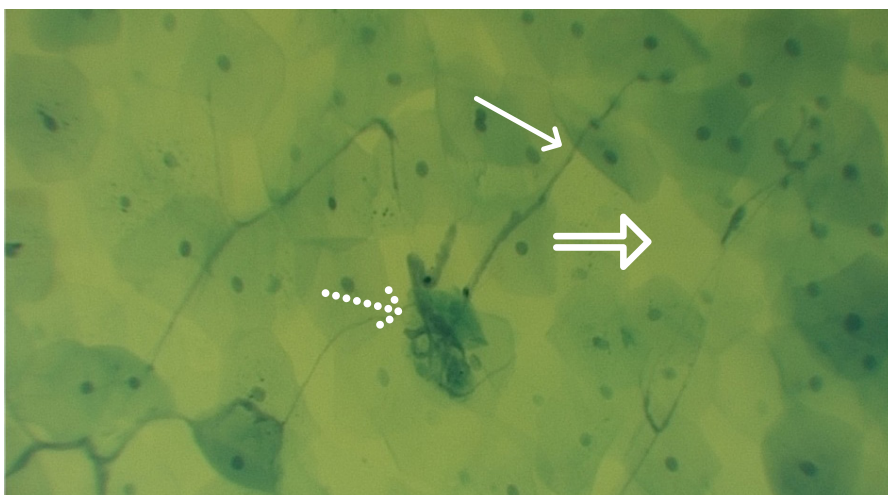


Fig. 8 - Endsocopia de contacto 150X. Células dobradas (seta) podem confundir-se facilmente com hifas fúngicas. Célula dobrada individualmente (seta descontinua). Espaços correspondentes a células descamadas (seta larga).

A aderência ocasional de alguns elementos celulares à lente do endoscópio é frequente (Fig. 9). Acreditamos que, na maioria das situações, são células que já se encontravam naturalmente descamadas, como se pode observar na figura 9, em que as células que ficam coladas à lente do endoscópio já se encontravam descamadas e, por isso, destacadas das restantes, durante a observação (Fig.9).

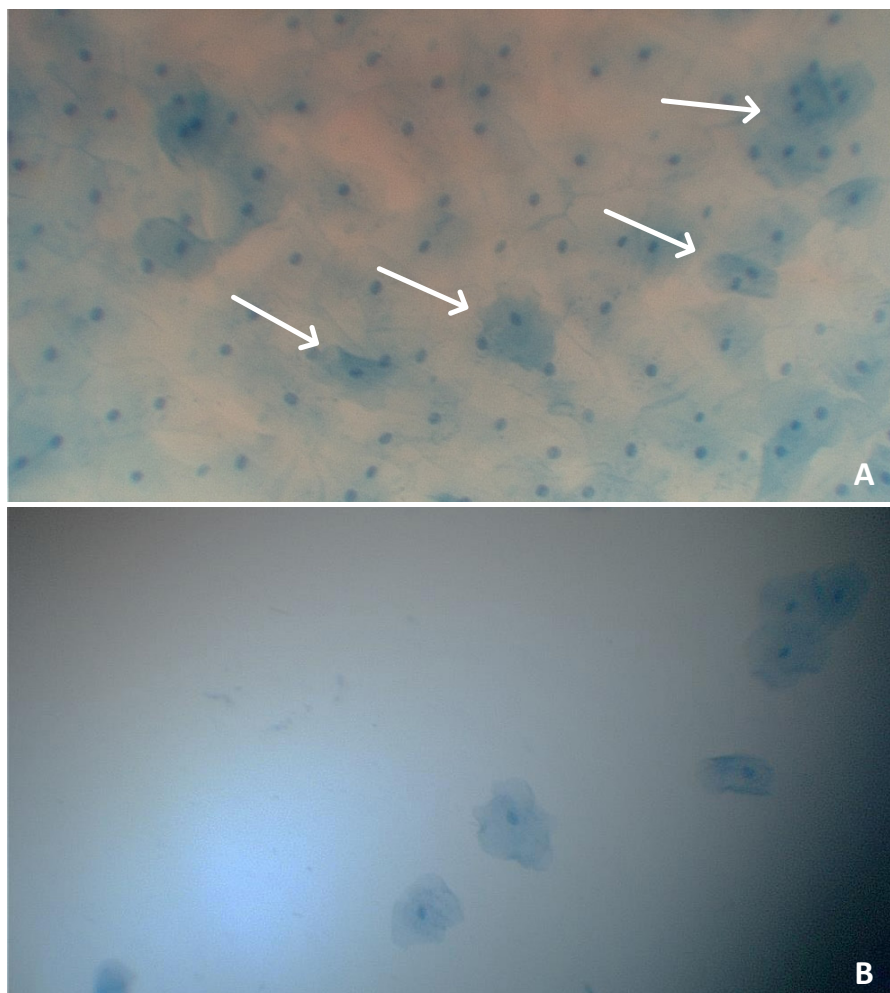


Fig. 9 - Endoscopia de contacto 60X.

A - Padrão normal, com algumas células aparentemente em início de descamação (setas);

B - As mesmas células ficaram aderentes à lente do endoscópio após a observação.

No entanto, o deslizamento da ponta do endoscópio na superfície da mucosa deve ser realizado com a menor pressão possível, de forma a evitar a descamação das camadas superficiais. Este artefacto, por ser fácil de identificar, não introduz alterações significativas no padrão celular (Fig. 10).

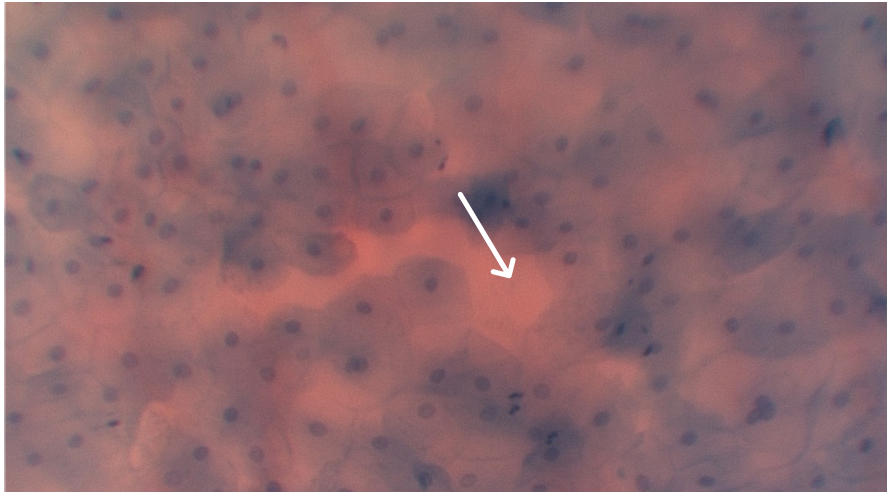


Fig. 10 - Endoscopia de contacto. Áreas brancas (seta) correspondentes a células que descamaram já após a coloração com azul de metileno.

O excesso de azul de metileno pode provocar manchas (Fig. 11), induzindo diagnósticos falsos positivos, resultantes de alterações da forma e coloração dos núcleos e de aspectos gerais de heterogeneidade dos tecidos que podem sugerir malignidade. Assim, deve evitar-se o excesso de deposição de corante sendo preferível repetir a coloração se necessário. O excesso de corante pode remover-se com uma lavagem com soro ou, simplesmente, esperando a sua normal dispersão. As lavagens intempestivas com gaze, esponja de gelatina (spongostan®) ou com outros materiais passíveis de provocar abrasão, também podem levar à descamação artificial da superfície do epitélio criando artefactos.



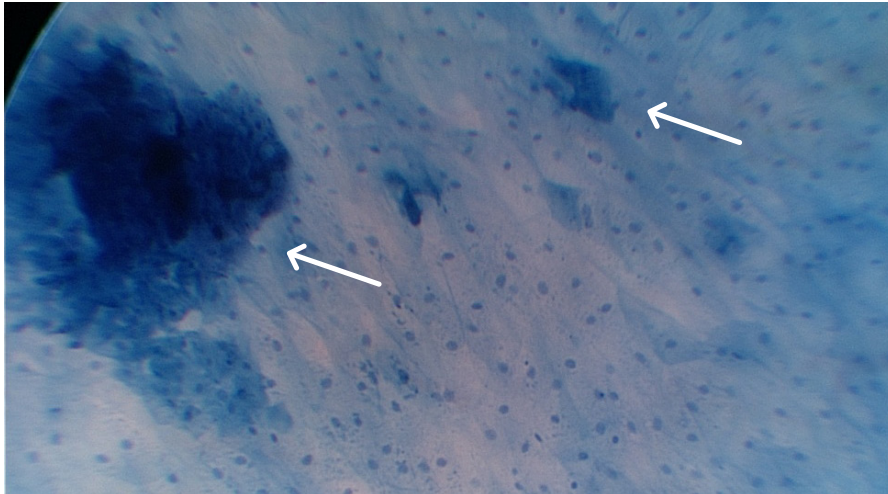


Fig. 11 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão de homogeneidade celular interrompido por elemento hipercorado (seta), correspondente a excesso de azul de metileno.

Para além da visualização das células epiteliais e da microcirculação subepitelial podemos observar os ostia de glândulas salivares (Fig.12). As pequenas variações de pressão da ponta do endoscópio sobre a superfície podem estimular a abertura do *ostium*.

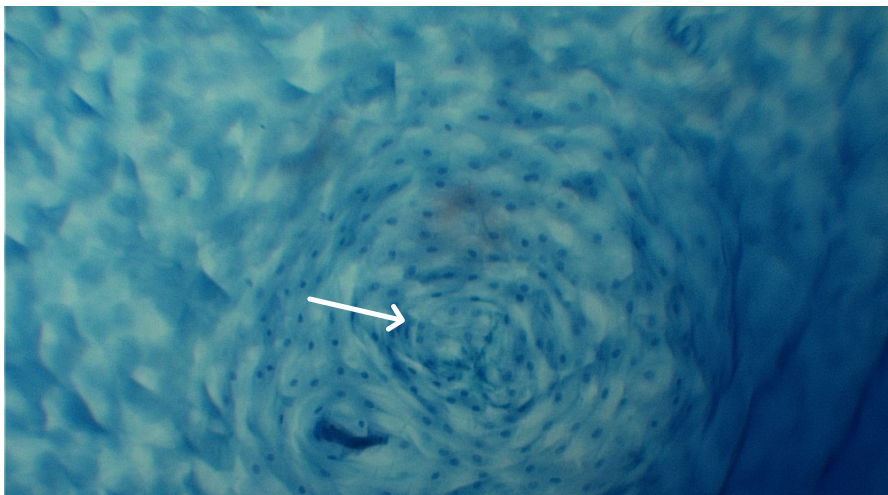


Fig. 12 - Endoscopia de contacto 60X. *Ostia* glandular com lúmen encerrado (seta). Observa-se disposição celular em espiral típica da porção mais externa do canal excretor.

Estas pequenas oscilações são, igualmente, úteis para avaliar a circulação. Na observação da circulação dos glóbulos vermelhos, a pressão tem que ser mínima, pois estes capilares colapsam facilmente ao encostar a ponta do endoscópio.

## **MATERIAL**

### **EQUIPAMENTO UTILIZADO**

- Endoscópio de contacto Karl Storz ref. 8715 AA. 23 cm de comprimento; 5,5 mm de diâmetro; angulação da lente de 0º; ampliação de 60 e 150 aumentos.
- Fonte de Luz xénon Karl Storz ref: 175 201315 20
- Camara SCB image 1 pure HD Karl Storz 26156
- Gravador de imagem Aida Control Neo Karl Storz 200461 20

### **CONSUMÍVEIS UTILIZADOS**

- Azul de metileno 1%
- Esponja de gelatina absorvível (Spongostan®)

## **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CLÍNICOS PARA REALIZAR O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO**

Após um curso teórico prático de 3 horas sobre endoscopia de contacto na mucosa oral, realizado no âmbito das primeiras jornadas de medicina oral da Faculdade de Medicina de Lisboa que decorreu em 2015, apresentámos aos 12 clínicos que participaram no curso (11 internos da especialidade de otorrinolaringologia e 1 interno da especialidade de estomatologia) as imagens de endoscopia de contacto de 10 lesões da mucosa oral e pedimos-lhe para, por escrito, fazerem o diagnóstico de benigno Vs Maligno de cada um dos casos. Também por escrito foi pedida autorização para utilizarmos as respectivas respostas para estudos posteriores. Os participantes responderam, ainda a duas perguntas de escolha múltipla:

**Pergunta 1 - Qual o grau de conhecimento histológico que considera necessário para ter segurança na interpretação de imagens obtidas por endoscopia de contacto?**

**Pergunta 2 - Qual o grau de risco que julga poder existir para o doente se o diagnóstico de o diagnóstico de endoscopia de contacto usado como complemento da clínica e da anatomia-patológica, estiver errado?**

### **ESTUDO ESTATÍSTICO:**

As variáveis, em escala de medida nominal, foram caracterizadas por frequências absolutas e/ou relativas simples ou condicionais e as variáveis em escala de medida métrica por média  $\pm$  desvio padrão.

Os testes de diagnóstico estudados ao longo do estudo foram abordados segundo quatro vertentes:

1- Associação com o estado do paciente quando avaliado por teste padrão escolhido: resíduos ajustados, teste Qui-quadrado ou teste Exacto de Fisher.

2- Grau de concordância entre os dois modos de classificação: Índice de Concordância *Kappa* (Cohen, 1960).

3- Capacidade discriminativa: sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança do positivo e/ou do negativo.

4- Capacidade preditiva: valor preditivo do positivo, valor preditivo do negativo e exactidão.

Os intervalos de confiança a 95% apresentados são assimétricos tendo em conta os valores elevados das frequências obtidas (*Categorized Data Analysis, Alan Agresti, Wiley Interscience, segunda edição, 2002*)

Tendo em conta que estivemos sempre perante tabelas de dupla entrada nos testes de independência, foi usado o teste Qui-Quadrado ou o teste Exacto de Fisher, conforme todos os valores esperados se apresentaram maiores ou iguais a 5 ou não. Os resíduos ajustado foram apenas considerados como informação complementar.

Quer as características vasculares quer as características celulares foram submetidas a uma análise exploratória com Análise de *Clusters* Hierárquica para Variáveis pelo método Between-groups linkage e distância *Ochiai*. O número de Clusters considerados apoiou-se no Dendograma tendo em conta a significância clínica e apresentou sempre uma retenção de mais de 90% da variância total.

A consistência interna da classificação quer pelas características celulares quer pelas características vasculares foi estimada pelo Coeficiente  $\alpha$  de *Cronbach*.

A hipótese de igualdade das proporções na classificação de malignidade pelas várias características celulares foi testada pelo teste não paramétrico Q de Cochran com recurso a comparações múltiplas. A mesma abordagem foi feita para as características vasculares.

Foi considerado um nível de significância de 5%. Todo o tratamento estatístico foi desenvolvido utilizando o software estatístico para tratamento de dados IBM®SPSS®, versão 22.

## TESTE DA ÁRVORE DE DECISÃO

Uma árvore de decisão é uma estrutura de suporte gráfico para a decisão sendo um dos modelos mais utilizados na inferência indutiva. Nestas estruturas cada nó interno representa um teste a um dado atributo, neste caso a um dado factor ou achado celular ou vascular. Cada ramo representa o resultado desse teste e cada folha uma classe final, após serem testados todos os atributos. Destas árvores podem obter-se regras para classificar novas operações.

Foram criadas árvores de decisão em que a classificação teste padrão é dada pelo resultado do exame anatomopatológico da biópsia (1 representa maligno e 0 representa não maligno) e os atributos binários (1 ou 0) a considerar correspondem às seguintes variáveis:

- C1- Heterogeneidade celular – Malig 1
- C2- Forma – Núcleo irregular – Malig 1
- C3- Relação núcleo/citoplasma irregular – Malig 1
- C4- Coloração núcleo irregular – Malig 1
- C5- Mitoses – Malig 1
- C6- Nucléolos – Malig 1
- C7- Hiperqueratose irregular – Malig 1
- V1- Heterogeneidade vascular – Malig 1
- V2- Ectasias e dismorfismo vascular – Malig 1
- V3- Glóbulos vermelhos extravasados – Malig 1
- V4- Microtromboses – Malig 1

Os resultados foram obtido através do software IBM SPSS Statistics versão 22.



## CAPÍTULO 3

# RESULTADOS





# ENDOSCOPIA DE CONTACTO

## PADRÃO NORMAL DA MUCOSA ORAL

### PROCEDIMENTO

A realização da endoscopia de contacto na mucosa oral começa com a explicação ao doente sobre o objectivo do procedimento e os vários passos da sua execução. O doente deve estar confortavelmente sentado, podendo a cadeira estar orientada por forma a que possa seguir no monitor as imagens da endoscopia, se o desejar. A necessidade de apoio de enfermagem ou de outro médico depende da área a observar, da experiência do executante e, principalmente, do grau de colaboração do doente, nomeadamente da sua capacidade para se manter imóvel. A necessidade de ajuda pode justificar-se para segurar ou apoiar a língua ou o lábio do doente ou para estabilizar a mucosa jugal, colocando uma mão a apoiar externamente a bochecha. O grau de experiência do executante determina também a necessidade de um segundo elemento para a realização da endoscopia de contacto. Após alguma experiência com a técnica, é possível a utilização de apenas uma mão para segurar, focar, estabilizar e mover firmemente o endoscópio, libertando a outra mão para ajudar a imobilizar a área da mucosa oral a observar.

A preparação do instrumental resume-se a conectar o endoscópio à fonte de luz e, eventualmente, a uma câmara de vídeo. Começamos por utilizar o endoscópio de contacto tal como um endoscópio clássico, para complementar a observação clínica macroscópica. Estaremos assim aptos a realizar uma caracterização mais completa das lesões, permitindo determinar quais as áreas com maior suspeita clínica de doença ou de malignidade. Nesta fase, devemos estar já habilitados a definir a estratégia da avaliação por endoscopia de contacto, nomeadamente, qual a sequência das áreas a observar e quais as áreas mais suspeitas.

Em seguida passamos à etapa da observação microscópica. Começamos por realizar uma limpeza cuidada da mucosa a observar, para eliminar o excesso de saliva que impede o contacto directo da lente do endoscópio com a superfície epitelial e impede a absorção do corante pelas células. Esta fase de remoção de excesso de secreção deve ser realizada com um fragmento de spongostan® ou um cotonóide. Utilizamos pequenos fragmentos de spongostan® realizando pequenos toques na área a estudar,

promovendo a absorção do excesso da saliva, evitando esfregar ou raspar a superfície da mucosa. Existindo quantidades muito excessivas de secreção, pode realizar-se uma aspiração indirecta, evitando tocar a superfície com a cânula. Qualquer acção que durante a limpeza provoque abrasão da superfície epitelial pode provocar artefactos, nomeadamente, por condicionar descamação celular iatrogénica ou alterar características da microcirculação.

O primeiro procedimento é a observação da microcirculação sem qualquer coloração. Começamos por regular o endoscópio para uma ampliação de 60 aumentos e a intensidade da luz para valores próximos do mínimo. Encostamos a ponta do endoscópio na superfície da mucosa e realizamos a focagem para o plano vascular, bastando para isso uma pequena rotação do botão de focagem. Começamos por regular a pressão que exercemos com a ponta do endoscópio. Uma pressão exagerada condiciona o colapso do lúmen vascular impedindo os glóbulos vermelhos de circular. Como as paredes dos vasos não têm contraste natural, sendo por isso invisíveis para esta técnica, a coloração é apenas garantida pela hemoglobina. A imagem vascular está completamente dependente da circulação sanguínea, que não deverá ser modificada por factores externos, garantindo-se assim a obtenção de dados fiáveis sobre a morfologia e cinética microcirculatórias.

Os vasos podem ser observados em simultâneo com as células após coloração com azul de metileno e, provavelmente, com melhor qualidade de imagem. Embora o corante não alcance o plano vascular, o contraste entre o vermelho dos eritrócitos e o azul do plano celular realça os vasos. Durante a observação da microcirculação sem coloração, não é possível observar células e podemos estar a condicionar alguns artefactos com a passagem repetida da ponta do endoscópio na superfície da mucosa, principalmente, em lesões friáveis. Considerando estes pressupostos, a primeira abordagem microscópica sem coloração prévia deve ser executada apenas quando temos um interesse especial para a observação e caracterização da microcirculação. Tendo estes factos em conta, no nosso estudo, a microcirculação só foi observada após coloração.

Para a coloração utilizamos um corante vital, o azul de metileno a 1%. A aplicação é realizada com um pequeno fragmento de spongostan® embebido no pigmento que encostamos tenuemente à superfície, “pintando” apenas a área a observar. De imediato, tocamos levemente a superfície com a ponta do endoscópio e focamos para um plano superficial, que nos vai permitir observar as células epiteliais. Se focarmos para um plano um pouco mais profundo, observamos o plano da microcirculação. Realizando

pequenas oscilações de focagem, podemos conseguir focar o plano celular e vascular em simultâneo com qualidade de imagem razoável.

É fundamental estabilizar a ponta do endoscópio de contacto pois as ampliações de 60 e 150 aumentos não são compatíveis com qualquer tremor ou oscilação, pois estes movimentos determinam imagens de má qualidade. Para os clínicos com pouca experiência com a técnica, sugerimos a utilização do indicador e do polegar da mão esquerda para segurar o endoscópio a cerca de 3 a 4 cm da extremidade distal. A mão direita segura a câmara e o indicador e o polegar direitos são mantidos permanentemente a segurar o botão de focagem (Fig. 1). Ao utilizarmos as duas mãos para segurar e manusear o endoscópio é normalmente necessário um ajudante, para fixar a área da boca a observar. Esta estabilização é ocasionalmente garantida pelo próprio paciente, quando é mais colaborante.



Fig. 1- Pormenor da acção da mão direita sobre a câmara e o endoscópio e o respectivo botão de focagem.

## **PADRÃO DE NORMALIDADE NA OBSERVAÇÃO POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO**

A mucosa da cavidade oral é coberta por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado na mucosa de revestimento e queratinizado na mucosa mastigatória e, em alguns casos, também na mucosa especializada. Existem no entanto pequenas variações nos diferentes territórios que iremos descrever com base nas observações realizadas neste estudo. Vamos designá-los padrões de normalidade e servirão de referência para as situações consideradas patológicas.

### **LÁBIO**

#### **REGIÃO CUTÂNEA DO LÁBIO**

A pele do lábio é observada como um plano amorfo e irregular corado de azul claro onde na maioria das situações não se distinguem os limites das células. Não se observam núcleos ou outros organitos celulares. Este padrão é típico de todos os epitélios com grande ortoqueratinização. As camadas celulares superficiais involuíram com o desaparecimento de núcleo e organitos e com a acumulação progressiva de queratina. Esta queratinização impossibilita a observação das camadas mais profundas e em alguns casos a microvascularização (Fig. 2). Na área mais próxima da transição para a mucosa, os limites das células são mais perceptíveis, observando-se as células mais individualizadas com forma de escama (Fig. 2).

A auto limpeza do corante é lenta - 5 minutos após a coloração a área ainda se encontra corada.

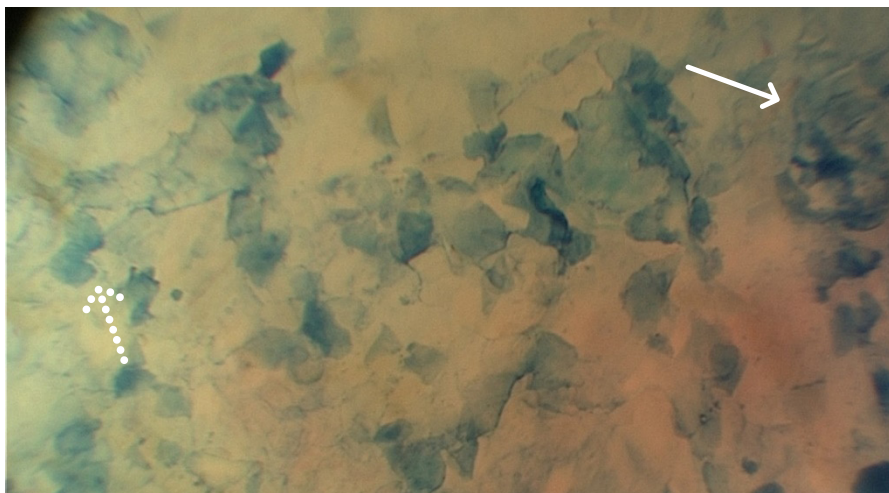


Fig. 2- Endoscopia de contacto 60 X. Lábio – área de pele próxima da área de transição pele-mucosa. Observam-se apenas células queratinizadas pouco individualizadas e muitas vezes mal delimitadas (seta). Algumas áreas já apresentam as células mais individualizadas ainda que hiperqueratinizadas (seta descontinua).

## ZONA DE TRANSIÇÃO DO LÁBIO

A zona de transição do lábio é observável em endoscopia de contacto como um epitélio com duas regiões distintas (Fig. 3): uma mais proximal à pele constituída por um epitélio com leve queratinização (ortoqueratinizado) que se observa com um padrão tipo pavimento de mosaicos, constituído por escamas poliédricas de dimensões e forma semelhantes dispostas de forma regular, sem núcleos visíveis, e regularmente coradas de azul claro: a outra porção da zona de transição mais proximal à mucosa possui células com núcleo picnótico alternando com células de núcleo de maiores dimensões (Fig. 3).

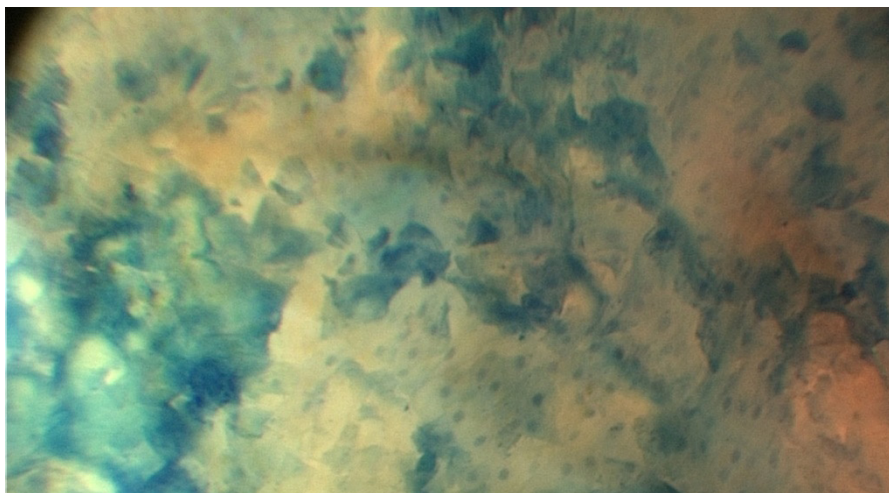


Fig. 3- Endoscopia de contacto 60X. Área de transição pele/mucosa – área de pele à esquerda sem núcleos visíveis; área mucosa à direita onde se observam células com núcleos de pequenas dimensões.

A circulação é caracteristicamente constituída por vasos em ansa de diâmetro relativamente grande, superior aos observados no palato e na mucosa jugal. A sua distribuição exhibe grande densidade por unidade de superfície (Fig. 4). As ansas correspondem aos eixos vasculares das papilas epiteliais/conjuntivas que são grandes e abundantes para poderem garantir a nutrição de um epitélio com grande espessura. A arquitectura da microcirculação é harmoniosa e homogénea, formando um padrão regular em toda a área. A velocidade de circulação dos glóbulos vermelhos é harmoniosa e facilmente interrompida por uma leve pressão da ponta do endoscópio. O alívio da pressão repõe instantaneamente uma circulação harmoniosa com todas as suas características morfológicas e cinéticas.

## REGIÃO MUCOSA DO LÁBIO

A mucosa do lábio é coberta por um epitélio constituído por células com uma relação núcleo-citoplasma maior do que a encontrada na zona de transição anteriormente descrita. As células mantêm as mesmas dimensões mas os seus núcleos são maiores. Assim a relação núcleo/citoplasma aumenta, mas é homogénea e sem grandes variações (Fig. 4). O nucléolo é frequentemente visível. Os limites citoplasmáticos são relativamente bem definidos mas muitas vezes são imperceptíveis. Nestes casos, tal como nas preparações de microscopia óptica, inferimos o número de células e a sua forma pelo número e forma dos núcleos.



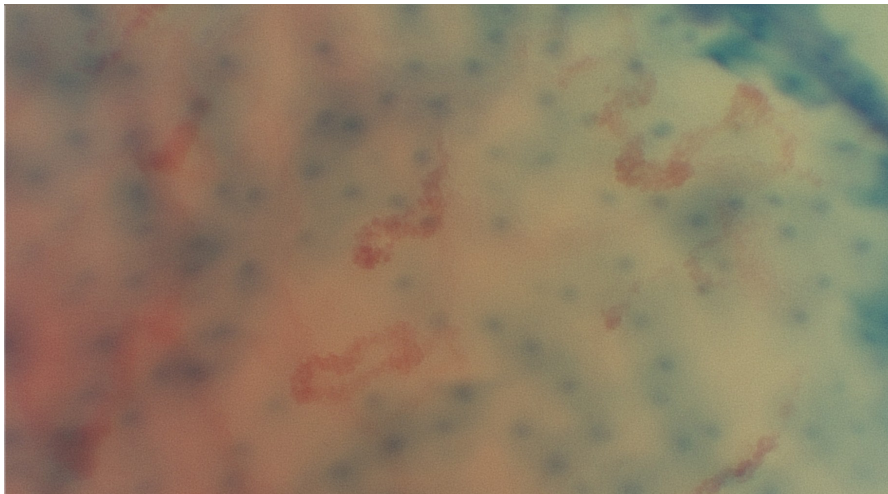


Fig. 4 - Endoscopia contacto 60X. Região mucosa do lábio, vasos focados no plano sub-epitelial desfocando ligeiramente as células sobrejacentes, mantendo possível a observação e descrição da morfologia celular. As ansas são normalmente mais longas e de menor diâmetro que na região de transição mas com uma densidade semelhante.

A microvascularização é, tal como descrito para a área de transição, constituída por vasos em ansa com forma semelhante mas normalmente mais longas. A sua distribuição apresenta uma densidade relativamente elevada, indistinta da área de transição (Fig. 3, 4).

Os vasos mais próximos do sulco queilite gengival são, por vezes, de disposição longitudinal paralela ao sulco ou com disposição em “ramo de árvore”. Só raramente se observam os orifícios excretorios das glândulas. A auto limpeza do corante é lenta mas muito mais rápida do que a da registada na pele, começando após um a três minutos.

Observam-se algumas micro-pregas epiteliais com orientação predominante paralela ao eixo maior do lábio, que desaparecem quando a mucosa é distendida. Estas estruturas funcionam como uma reserva de superfície da mucosa que permite o seu movimento e distensão sem que se originem roturas (Fig. 5).

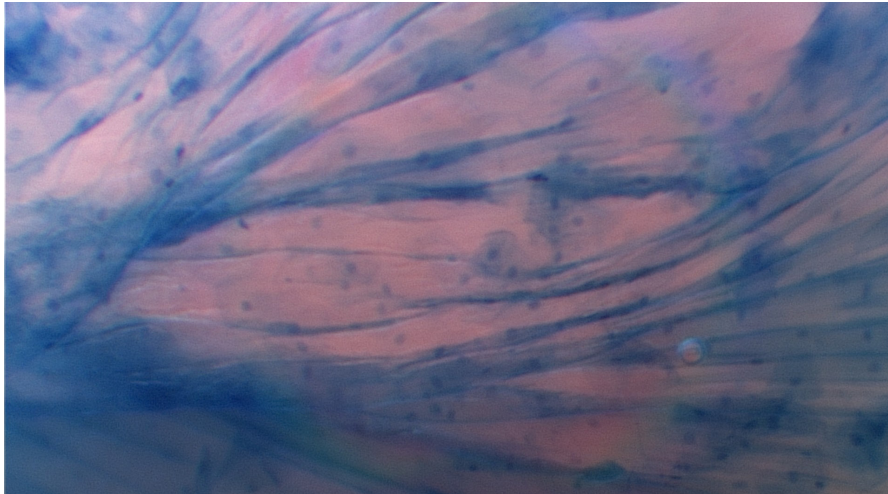


Fig. 5 - Endoscopia contacto 60X. Região mucosa do lábio, observam-se micropregas abundantes paralelas ao sulco queilite-gengival.

## PALATO

O palato subdivide-se em duas regiões, o palato duro e o palato mole. A porção mais anterior denomina-se palato duro, devido ao facto da mucosa estar apoiada numa placa óssea formada pelos processos palatinos do maxilar. O palato mole corresponde à porção posterior e adquire esta denominação devido a tratar-se de uma estrutura móvel fibromuscular sem suporte ósseo.

### PALATO DURO

O palato duro é um território sujeito a grande stress mecânico. Esta região funciona como apoio para o dorso da língua, ajudando na mistura da saliva e suas enzimas com o bolo alimentar e na própria mastigação e deglutição. Assim sendo, é importante a existência de uma grande espessura epitelial com uma queratinização superficial muito regular (ortoqueratinização). O epitélio do palato duro possui uma microvascularização constituída por vasos associados às papilas conjuntivas.

O terço posterior do palato duro, ao contrário da porção mais anterior, possui uma grande quantidade de glândulas salivar minor.



A mucosa desta área cobre uma base óssea muitas vezes não plana. Algumas áreas necessitam de uma orientação especial da ponta do endoscópio para garantir que a sua superfície encosta em toda a extensão da lente. A mucosa do palato duro observada por endoscopia de contacto revela um padrão de pavimento constituído por células poliédricas sem núcleo visível. Com a ampliação menor de 60 aumentos podemos observar um padrão homogéneo que demonstra uma grande regularidade na disposição destas células. Esta disposição é pontualmente interrompida pelo aparecimento de *ostia* glândulares (Fig. 6, 7, 8).

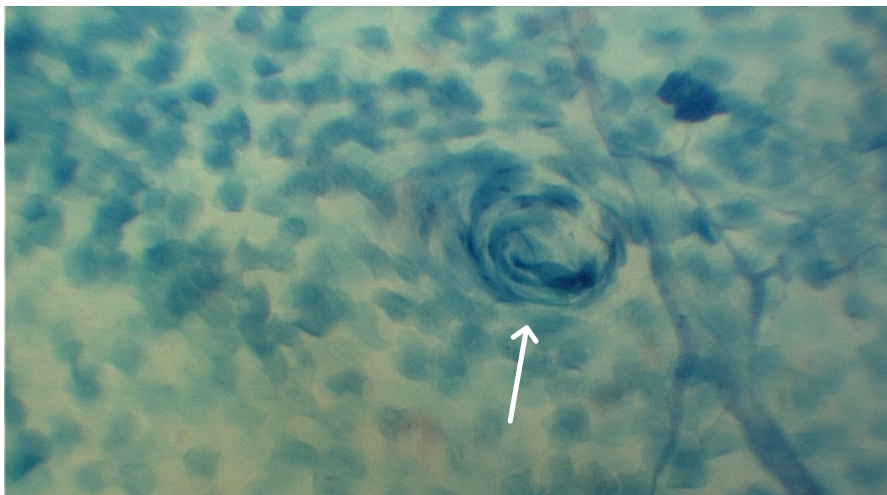


Fig. 6- Endoscopia de contacto 60X, azul de metileno. Palato duro – *ostium* de glândula (seta). Observam-se células poliédricas sem núcleo tipo escama com forma e dimensões semelhantes, formando um padrão tipo mosaico regular de aspecto homogéneo.

Observámos os *ostia* e a porção mais externa do canal excretor, onde se identificam as células não queratinizadas dos canais excretores dispostas em espiral, e que nos dão a noção tridimensional de profundidade do referido canal (Fig. 7, 8a, 8b). Realizámos preparações histológicas com cortes paralelos à superfície para melhor entender as imagens das observações por endoscopia de contacto (Fig. 9). Estas glândulas são relativamente fáceis de detectar, o que demonstra uma densidade significativa, que vai aumentando da frente para trás na direcção do palato mole.

A abertura e o encerramento destas glândulas faz-se por um sistema tipo diafragma de câmara fotográfica. Ocasionalmente, é possível observar a secreção em período de expulsão. Nem todos os *ostia* das glândulas da mucosa aerodigestiva funcionam desta

forma; por exemplo as glândulas da rinofaringe e algumas das fossas nasais apresentam uma configuração em fenda com aparente abertura permanente.

Com a ampliação de 150 aumentos observa-se, com mais detalhe, a área envolvente dos *ostia*, destacando-se os queratinócitos sem núcleo visível por o citoplasma se apresentar totalmente preenchido por queratina (fig. 8, 9).

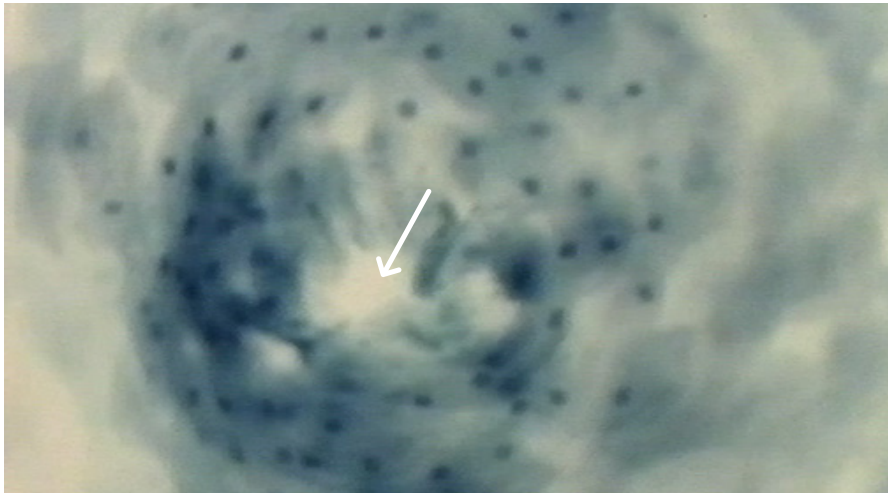


Fig. 7- Endoscopia de contacto 150X. Palato duro – *ostium* de glândula. Observação detalhada do canal excretor com células nucleadas. O *ostium* encontra-se semi-aberto (seta). Este *ostium* abre e fecha como o diafragma de câmara fotográfica.

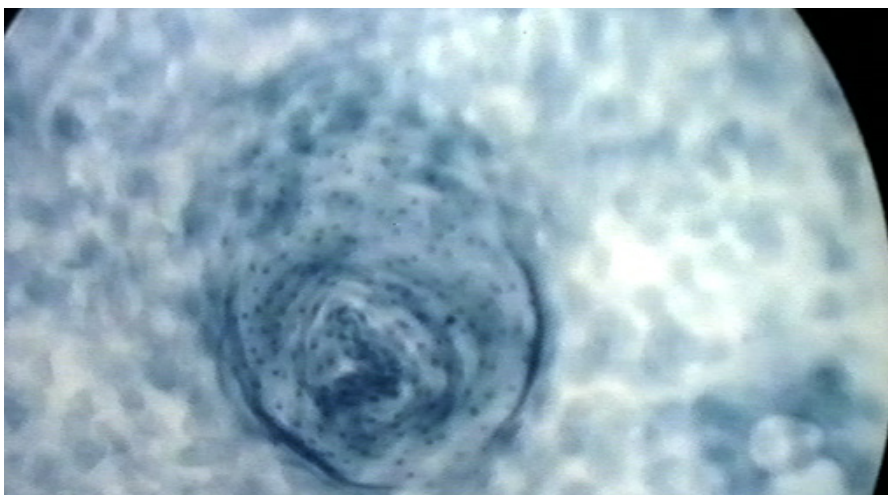


Fig. 8 - Endoscopia de contacto 60X. Palato duro – *ostium* de glândula. Observam-se células poliédricas tipo escama sem núcleo, de forma e dimensões semelhantes.

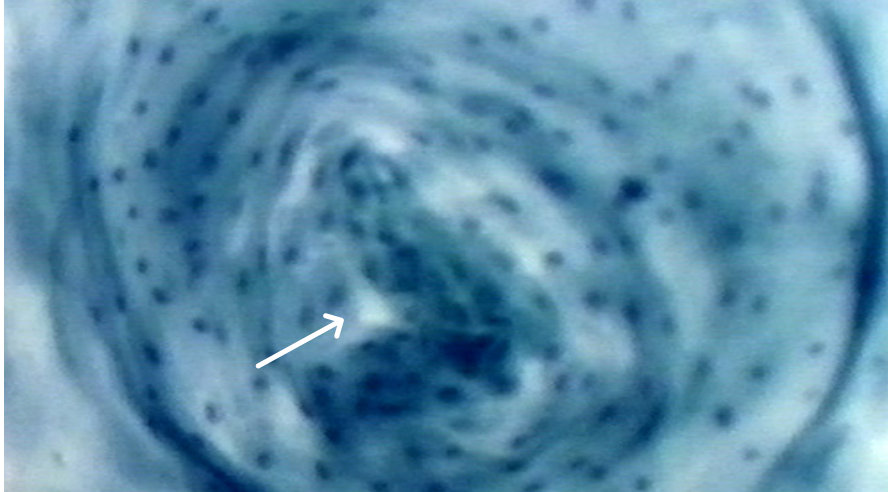


Fig. 8b - Endoscopia de contacto 150X. Palato duro – *ostium* de glândula. Observação detalhada do canal excretor com células nucleadas. Observa-se no centro o *ostium* da glândula (seta) com as células do canal excretor com núcleos visíveis conferindo em aspecto em espiral. Esta área está sujeita a menor stress mecânico por estar num plano mais profundo do que a superfície. Corresponde à transição epitélio glandular-epitélio de revestimento. O *ostium* encontra-se encerrado (seta).



Fig. 9 - Hematoxilina – eosina 400X. Microscopia óptica, corte da mucosa do palato duro paralelo à superfície, com o objectivo de estabelecer uma comparação com a imagem de endoscopia de contacto. Observa-se o lúmen do *ostium* (L).

A densidade de glândulas no terço posterior do palato duro aumenta muito, sendo semelhante à observada no palato mole. Frequentemente é possível observar mais do que um *ostium* por campo de observação (5,5 mm) (Fig. 10).

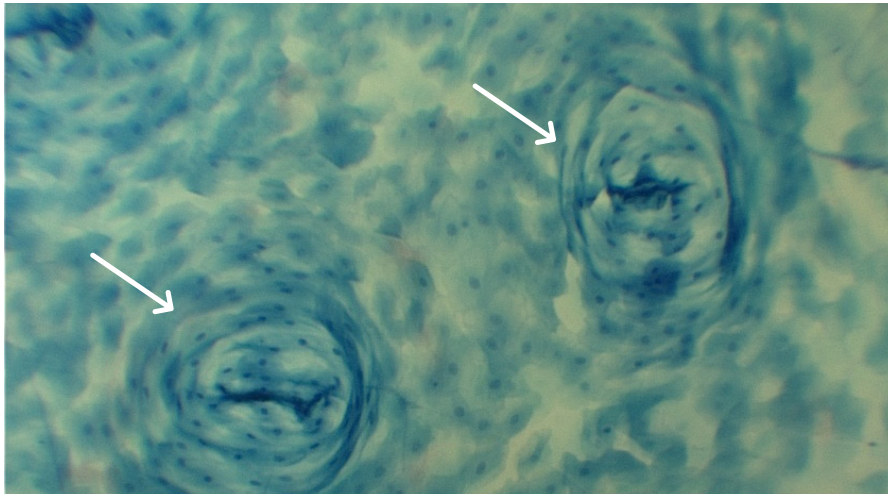


Fig. 10 - Endoscopia de contacto 60X. Mucosa do palato duro; transição para palato mole. Observam-se dois *ostia* glandulares (seta) no mesmo campo de visão do endoscópio, o que demonstra a alta densidade destas estruturas nesta localização.

Apesar da queratinização, é possível esporadicamente observar a microvascularização, constituída por ansas de pequenas dimensões sugerindo a existência de papilas epiteliais/ conjuntivas e dos respectivos vasos de nutrição. Estes vasos são difíceis de focar e a circulação sanguínea difícil de descrever e caracterizar (Fig. 11). São vasos resistentes ao trauma, com dimensões muito regulares, paredes lisas e sem ramificações ou ectasias.

Nalgumas áreas, provavelmente por uma maior acumulação de queratina, é difícil definir o limite das células, sendo apenas observada uma camada amorfa que fixa o corante com dificuldade.





Fig. 11- Endoscopia de contacto 60X. Células do palato duro de forma poliédrica sem núcleo visível. Adivinham-se ansas vasculares sub-epiteliais mais difíceis de observar devido à menor transparência celular por queratinização. Embora sem boa definição observam-se vasos em ansa (seta).

A maior ampliação (150X) permite observar com maior detalhe os queratinocitos e confirmar a ausência de núcleo visível, sendo observável o preenchimento do seu citoplasma por queratina. No terço posterior do palato duro, principalmente na transição para o palato mole, observam-se esporadicamente, células isoladas ou em pequenos grupos de dois ou três elementos celulares com núcleo. (Fig 12).

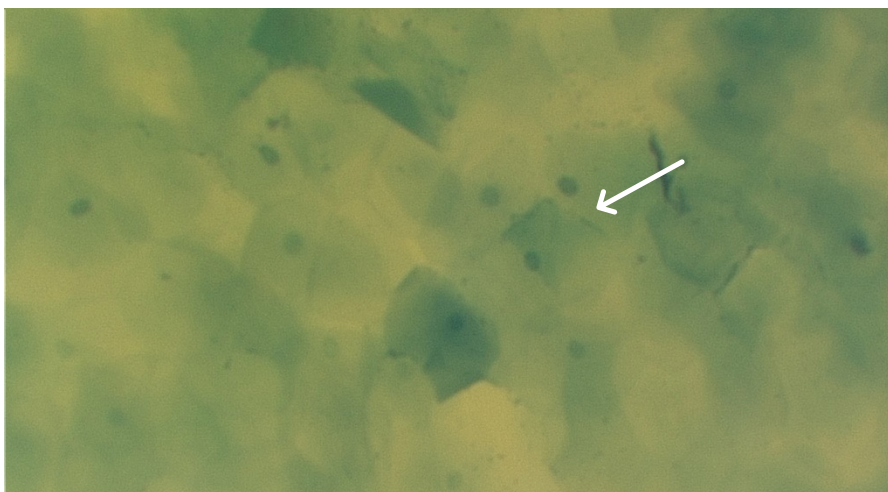


Fig. 12- Endoscopia de contacto 150X. Palato duro no início da transição para o palato mole. Células de forma poliédrica sem núcleo visível. Em grande ampliação é possível definir melhor a forma das células. Esporadicamente observam-se células com núcleos picnóticos (seta).

O tempo de auto limpeza do corante é lento, embora seja mais rápido no terço posterior do palato duro, área que contém mais glândulas. Nos dois terços anteriores é superior a 5 minutos, no terço posterior é superior a 2 minutos.

## PALATO MOLE

No palato mole a mucosa não possui nenhum suporte ósseo, sendo por isso, simples encostar a ponta do endoscópio e obter imagens de endoscopia de contacto de forma mais fácil e rápida do que ao nível do palato duro. No entanto, na extremidade posterior do palato mole, junto ao bordo livre, a falta de apoio da mucosa pode dificultar o contacto total da lente do endoscópio, determinando um maior grau de complexidade na observação. A execução pode ainda ser dificultada pelo reflexo do vômito, que está presente de forma exacerbada em alguns indivíduos.

O epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado apresenta-se na endoscopia de contacto com células de núcleos esferóides ou ligeiramente ovóides. Ao contrário do palato duro, os núcleos são sempre observáveis e têm dimensões e forma semelhantes, conferindo um aspecto homogéneo ao tecido. Embora na maioria dos casos seja possível uma boa observação da membrana citoplasmática, os limites da célula são ocasionalmente difíceis de definir com exactidão. No entanto, consideramos que estes limites citoplasmáticos são bem definidos em comparação com outros territórios da boca. Apenas na mucosa jugal e face ventral da língua se encontram melhor definidos à observação por endoscopia de contacto (Fig. 13, 14).

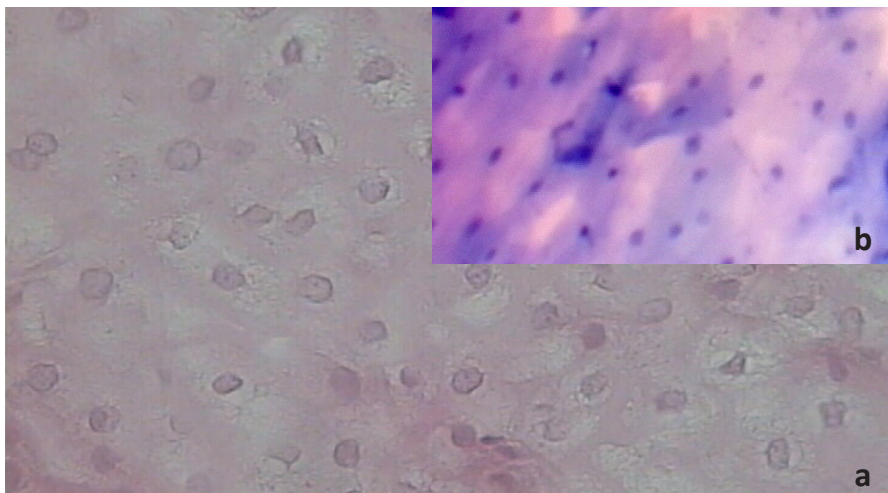


Fig. 13 a) Hematoxilina eosina 400X. Microscopia óptica. Observa-se epitélio pavimentoso estratificado em corte paralelo à superfície da mucosa do palato mole para comparar com imagem de endoscopia de contacto.

b) Endoscopia de contacto 150x azul de metileno. Observam-se núcleos corados de azul escuro e citoplasma azul claro com uma forma e disposição no espaço sobreponíveis ao que observamos em cortes paralelos à superfície em microscopia óptica.

A descamação das células superficiais é muito frequente. Podemos observar as células a descamar ou detectar áreas não coradas de forma poligonal que correspondem a espaços de células já descamadas (Fig. 14, 15). Esta facilidade de descamação facilita o descolamento ou o enrolamento destas células pela passagem da ponta do endoscópio sobre a superfície da mucosa. Observam-se frequentemente áreas poligonais não coradas ou linhas coradas de azul que obrigam a diagnóstico diferencial com hifas fúngicas.

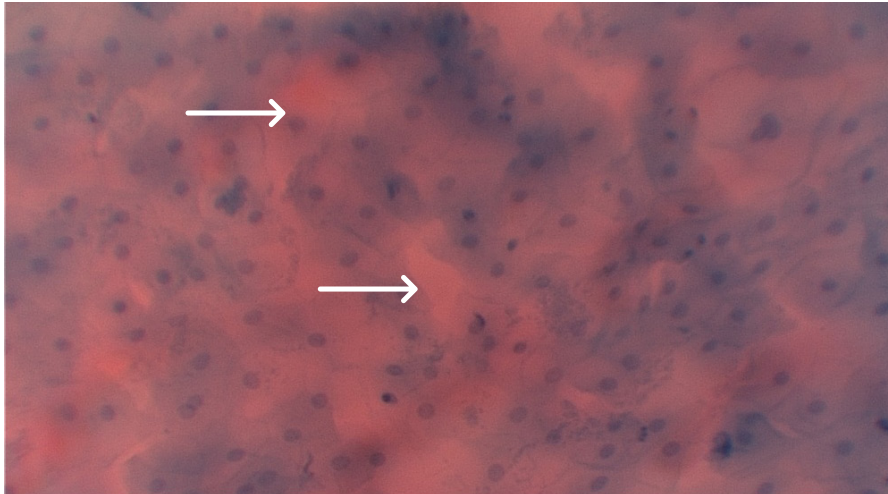


Fig. 14 - Endoscopia de contacto 60X. Células do palato mole com relação núcleo citoplasma relativamente grande mas semelhante entre toda a população celular, originando um padrão celular homogéneo. Observam-se espaços “em branco” resultantes da descamação de elementos celulares com essa localização (setas).

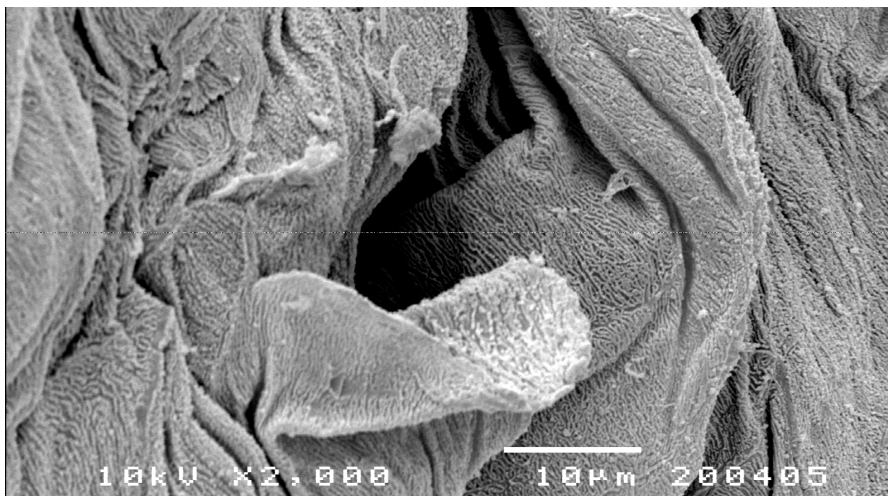


Fig. 15- Microscopia electrónica de varrimento. Observa-se epitélio pavimentoso estratificado em descamação no palato mole.

Observam-se micro-pregas epiteliais que estão associadas à elasticidade da mucosa nesta região e funcionam como um potencial de reserva do epitélio, permitindo a distensibilidade e os movimentos da mucosa sem criar tensões ou risco de rotura (Fig. 16, 17). Com a endoscopia de contacto podemos observar estas micro-pregas e descrever a sua orientação e distribuição. Podemos ainda avaliar as suas dimensões



através da variação da pressão da ponta do endoscópio, promovendo a distensão da mucosa e o respectivo desenrolamento e desaparecimento das pregas (Fig. 17). Ao contrário do que acontece em outros territórios da boca, como o lábio e a mucosa jugal, estas micro-pregas orientam-se em diferentes direcções. Este facto está provavelmente associado à necessidade do palato mole possuir capacidade de distensibilidade em diferentes sentidos, durante a deglutição e a fala.

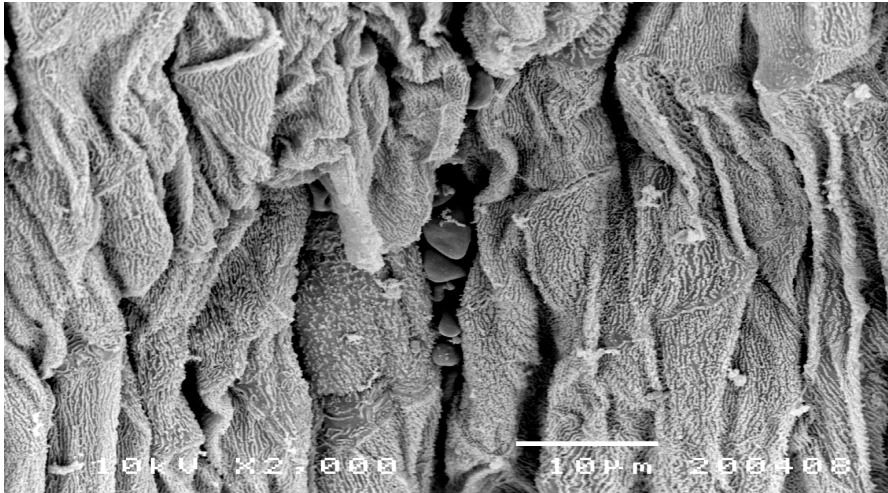


Fig. 16 - Microscopia electrónica. Mucosa do palato mole. Notem-se as micro-pregas da superfície da mucosa.

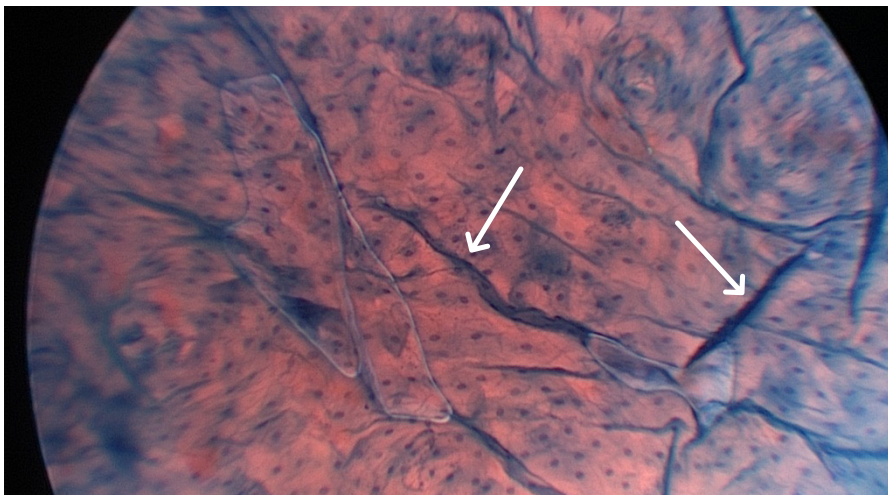


Fig. 17- Endoscopia de Contacto micro-pregas (setas) do epitélio que facilitam a distensão e alteração da forma do palato mole durante a deglutição e fala. As pregas orientam-se em diferentes direcções.

O epitélio do palato mole é do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado (Fig. 18). A lâmina própria possui muitas papilas conjuntivas com a respectiva vascularização que, no seu conjunto, conferem um aspecto rosado ao palato. A observação com endoscopia de contacto permite-nos observar ansas vasculares longas, constituídas por vasos de pequeno diâmetro. As ansas orientam-se paralelamente e próximas entre si, o que está de acordo com a descrição histológica. No entanto, no palato mole existem áreas onde estas ansas são pouco evidentes observando-se uma vascularização em rede. Não existe aparentemente uma sistematização para a localização desta variação. A circulação possui uma cinética regular e é facilmente interrompida com pequenas pressões da ponta do endoscópio.



Fig. 18 - Endoscopia de Contacto 60X com zoom. Vasos em ansa em grande número por unidade de superfície e com ansas longas.

O número de *ostia* das glândulas salivares nesta região é elevado. Observam-se na forma de núcleos em espiral, que ao focar e desfocar aparentam uma disposição tridimensional (Fig. 19). É frequente observarmos estas estruturas a abrir e a excretar. A abertura e o encerramento é do tipo diafragma de câmara fotográfica. Este é o território onde é mais simples determinar, pela observação macroscópica, onde se encontram os ostia glandulares. A observação de pequenas gotas de secreção no palato mole, muitas vezes em resposta a um pequeno aumento da temperatura provocada pela luz do endoscópio, orienta-nos exactamente para a área onde devemos encostar a lente para observar microscopicamente cada *ostium* glandular.

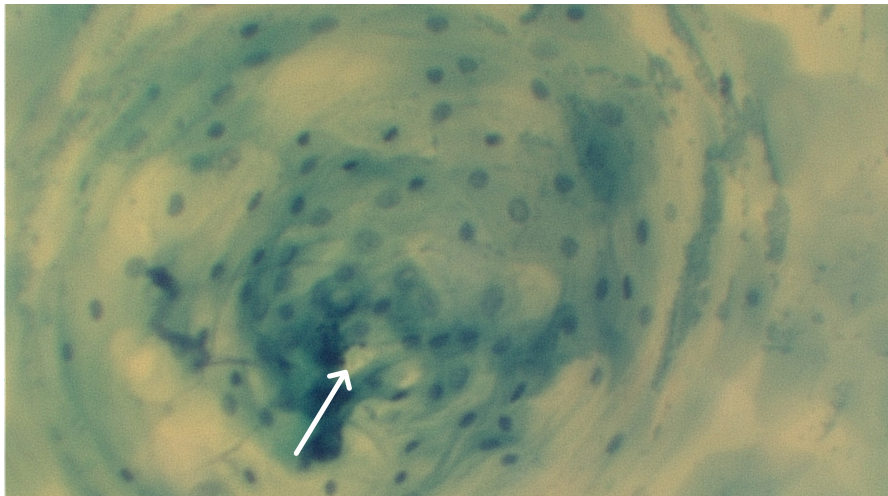


Fig. 19 - Endoscopia de contacto 60X. Palato mole – *ostium* de glândula encerrado (seta) detectável pelo efeito em espiral formado pela disposição dos núcleos das células do canal excretor. As células têm forma poligonal e núcleos pequenos esferóides. Os limites da membrana citoplasmática são bem visíveis nas células do canal excretor e nas células do epitélio de revestimento da superfície do palato mole, adjacentes ao *ostium*.

Realizámos preparações histológicas com cortes clássicos e paralelos à superfície para comparação com as imagens obtidas por endoscopia de contacto (Fig. 20). Pudemos entender melhor a disposição das células epiteliais na porção mais terminal do canal excretor ao encostar a ponta do endoscópio sobre os *ostia* das glândulas (Fig. 19).

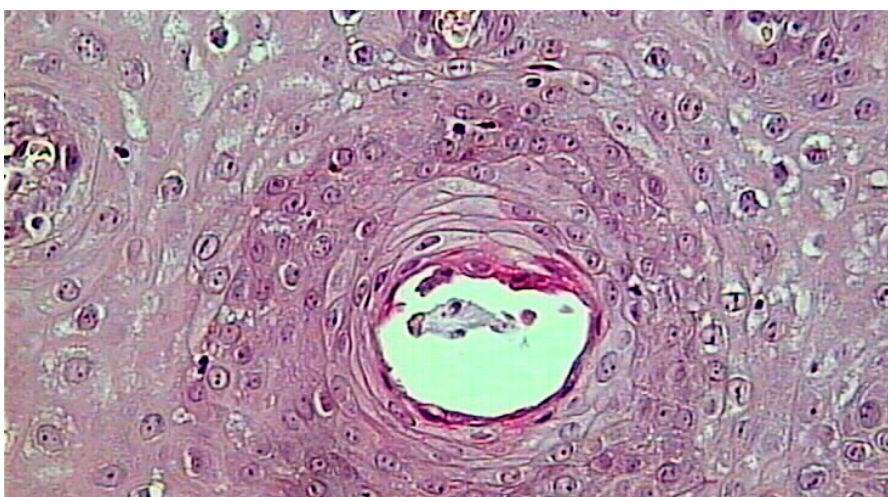


Fig. 20 - Hematoxilina – eosina 400X. Microscopia óptica, corte paralelo à superfície da mucosa. Identifica-se o lúmen do *ostium* da glândula (L).



Após a abertura do *ostium* da glândula, a excreção forma uma “bolha” de secreção junto ao orifício. Esta bolha atinge normalmente grandes dimensões sendo visível macroscopicamente. Após terminar o episódio de excreção, que é de tempo muito variável, o *ostium* fecha, desaparecendo o lúmen do canal excretor. Devido à disposição dos núcleos em formação espiralada podemos facilmente detectar os *ostia* das glândulas mesmo que estes se encontrem encerrados (Fig. 10, 19). Depois de detectado um *ostium*, se mantivermos a ponta do endoscópio sobre ele durante breves segundos e fizermos pequenos impulsos de pressão, podemos estimular a sua abertura. Este procedimento não é sempre eficaz e só deve ser realizado com a intensidade da luz no mínimo, para evitar que a persistência do endoscópio no mesmo ponto, durante um período de tempo prolongado, eleve a temperatura e possa provocar uma pequena lesão térmica que, apesar de rara, é possível nestas circunstâncias.

A auto limpeza do corante é mais rápida do que na maioria dos territórios da boca sendo apenas mais lenta do que no pavimento da boca. Este facto deve-se provavelmente à grande quantidade de secreção produzida por estas glândulas salivares que garantem uma boa lubrificação desta mucosa.

## MUCOSA JUGAL

A mucosa jugal é um dos territórios mais extensos da boca. A sua mucosa é fácil de observar com endoscopia de contacto. Tendo em conta a sua localização, é possível apoiar bem a ponta do endoscópio permitindo uma boa focagem e uma observação rápida de grandes áreas. Caso seja necessário, normalmente por menor colaboração do doente, é possível realizar um apoio externo do endoscópio colocando um ou dois dedos externamente ao nível da bochecha. O epitélio é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado. Observam-se células com limites bem definidos. Conjuntamente com a face ventral da língua é o território da boca com os limites citoplasmáticos melhor definidos. A forma poligonal das células é fácil de observar e descrever e é semelhante em todo o território (Fig. 21). Os núcleos têm forma esferóide ou ligeiramente ovóide e são normalmente picnóticos ou de dimensões ligeiramente maiores. A relação núcleo-citoplasma é muito baixa devido às reduzidas dimensões do diâmetro nuclear. Nas nossas observações, esta é a região da mucosa oral com núcleos de menores dimensões (Fig. 21, 22, 23, 24). No entanto, é frequentemente alvo de traumatismos dentários ou de outra natureza que podem contribuir para a existência de processos de inflamação crónica, levando eventualmente ao aparecimento de núcleos com as mesmas características morfológicas mas um pouco maiores (Fig. 25).

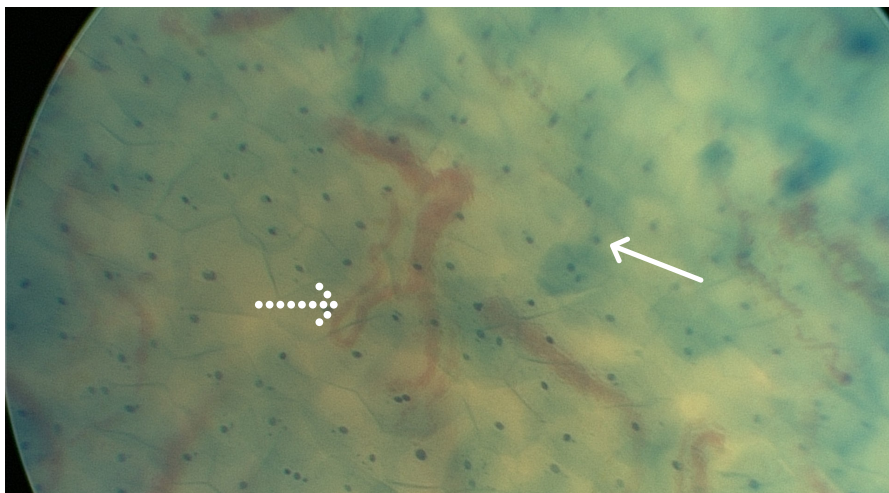


Fig. 21- Endoscopia de contacto 60X. Mucosa jugal. Células de limites bem definidos com núcleo picnótico (seta). Note-se o pormenor de, com um ponto de focagem intermédio, ser possível observar em simultâneo algumas ansas vasculares (seta descontinua).

A endoscopia de contacto permite observar bastantes vasos em ansa, longos, com disposição harmoniosa e em grande número. Todos possuem a mesma forma, tamanho e orientação (Fig. 22, 23) em concordância com a existência de bastantes papilas conjuntivas de grandes dimensões. Estes vasos não têm ectasias das paredes e a circulação no seu interior faz-se de uma forma harmoniosa.

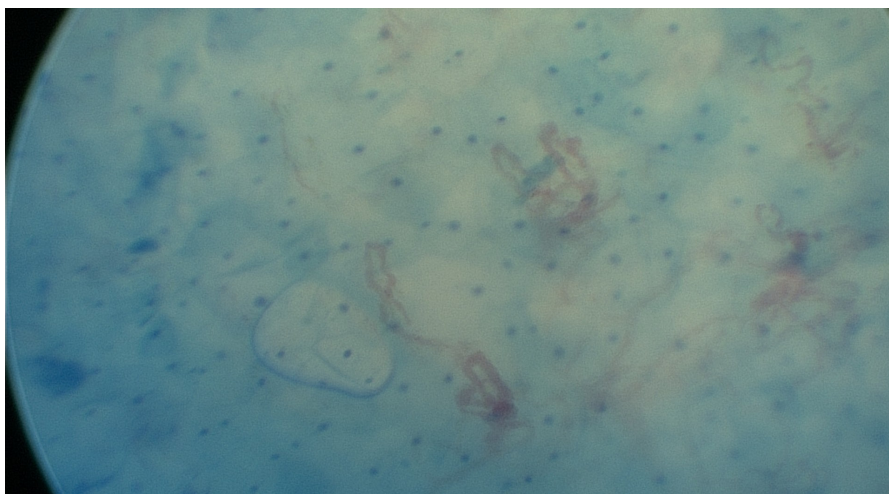


Fig. 22- Endoscopia de contacto 60X. Mucosa jugal. Células de limites bem definidos com núcleo picnótico. Nesta foto, um ponto de focagem intermédio permite observar em simultâneo células e vasos. Observam-se vasos com ansas longas e com grande densidade.

Estes vasos possuem uma elevada densidade por área e têm disposição paralela entre si, o que constitui uma das características mais importantes do critério de normalidade. Quando oscilamos ou alternamos a direcção da ponta do endoscópio, conseguimos promover a variação da orientação da disposição das ansas que ocorre caracteristicamente em uníssonos e no mesmo sentido.

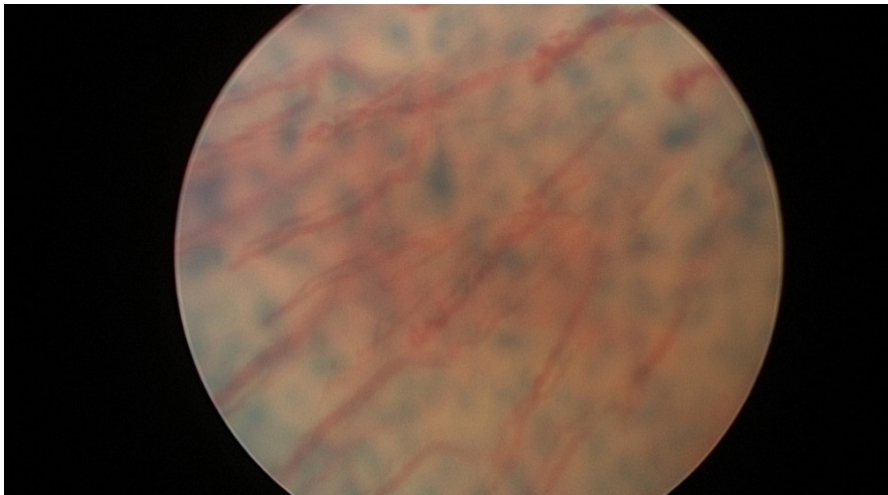


Fig. 23- Endoscopia de contacto mucosa jugal 60X. Vasos em ansa com elevada densidade. A orientação do endoscópio permite observar as ansas vasculares longitudinalmente demonstrando as suas grandes dimensões e a disposição harmoniosa. Nesta foto o ponto de focagem é dirigido para a área sub-epitelial desfocando as células que se encontram num plano mais superficial.

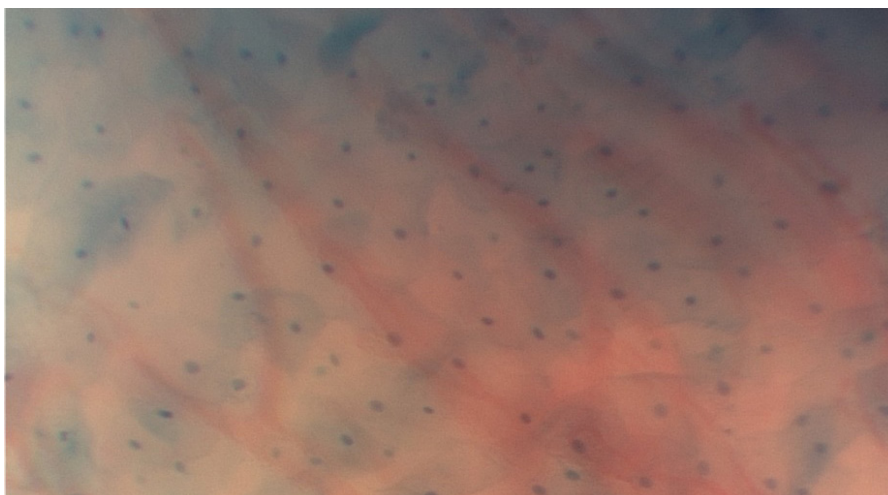


Fig. 24- Endoscopia de contacto mucosa jugal 60X + zoom. Pormenor com maior ampliação permitindo avaliar a regularidade dos vasos e as suas grandes dimensões em comprimento.

Tendo em conta a localização da mucosa jugal e a sua participação na mastigação e deglutição, que implica grandes variações dinâmicas nas dimensões da superfície desta área, seria de esperar que, tal como no palato mole, existissem micro-pregas da mucosa. Encontramos estas formações de forma constante, que abrem facilmente com um pequeno aumento da pressão da ponta do endoscópio, têm uma disposição mais ou menos paralela entre si e são perpendiculares às arcadas dentárias (Fig. 25).

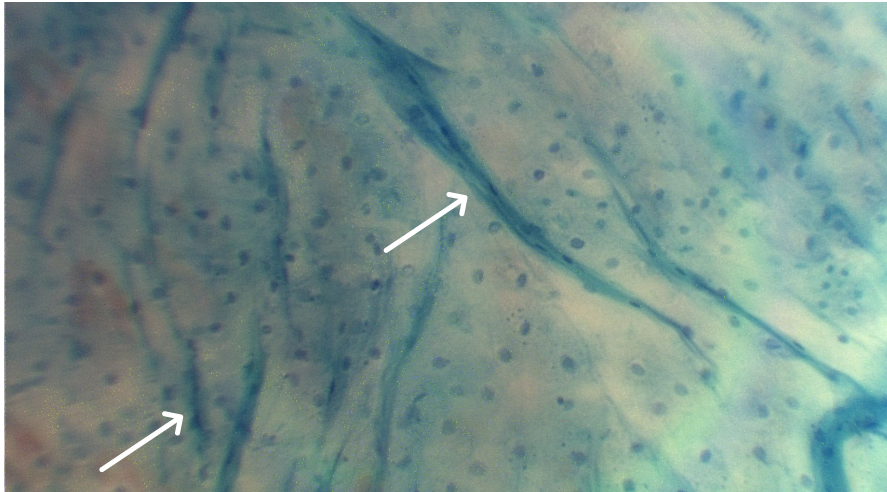


Fig. 25- Endoscopia de contacto 60X. Micro-pregas do epitélio da mucosa jugal (setas). Esta área possui núcleos de dimensões um pouco superior ao normal nesta região podendo sugerir um ligeiro processo inflamatório crónico que justificaria a existência nas camadas superficiais de células mais jovens e por isso com núcleos maiores.

Os *ostia* de glândulas observam-se esporadicamente sendo menos frequentes do que no palato (Fig. 26). Estes *ostia* possuem uma abertura tipo diafragma de câmara fotográfica, com dimensões relativamente grandes e apresentam uma fraca densidade por área. A mucosa jugal foi no nosso estudo uma das áreas onde observámos com menor frequência a abertura dos *ostia* glandulares. O estímulo artificial com a ponta do endoscópio revelou-se em todos os casos ineficaz para desencadear o processo.



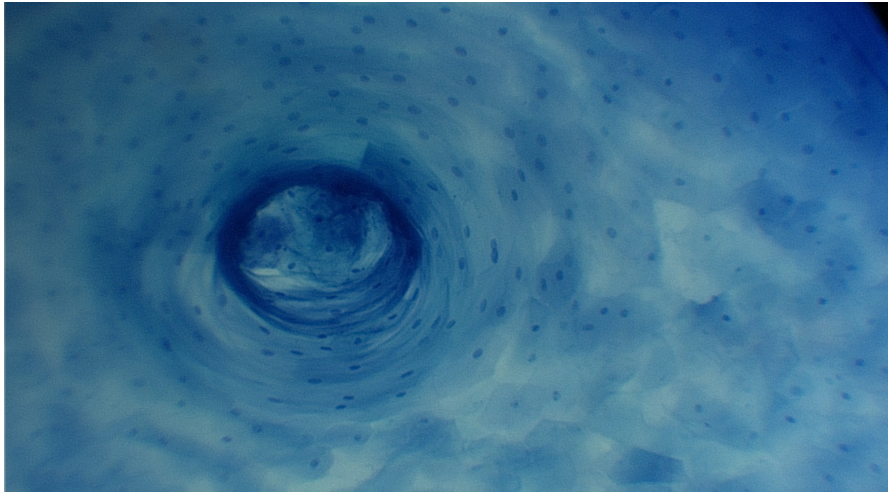


Fig. 26 - Endoscopia de contacto 60X. *Ostium* de glândula da mucosa jugal. Observa-se o aspecto espiralado do arranjo celular. Neste momento o *ostium* encontra-se encerrado. Observam-se células de núcleo picnóticos nas regiões vizinhas.

## MUCOSA DO TRÍGONO RETROMOLAR

A mucosa do trígono retromolar não é muito distinta da mucosa jugal na observação por endoscopia de contacto. No entanto, o facto de esta localização anatómica ser sede frequente de tumores malignos, leva-nos a considerar o seu estudo como área independente.

O epitélio é do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado. As células têm um limite bem definido, embora um pouco menos marcado do que na mucosa jugal e os núcleos são picnóticos, condicionando uma baixa relação núcleo-citoplasma (Fig. 27). Os vasos têm forma de ansa e, como o epitélio é de pequena espessura, não existe hiperqueratose sendo possível observar toda a estrutura da microcirculação. Descrevemos um aspecto arboriforme que, depois de originar várias ramificações, termina com os vasos em ansa.

Provavelmente esta é a mesma arquitectura nos outros territórios da boca. No entanto, a maior espessura do epitélio nestas áreas permite que a endoscopia de contacto tenha acesso apenas aos ramos terminais, que correspondem às ansas vasculares, que constituem os elementos mais superficiais (Fig. 27).



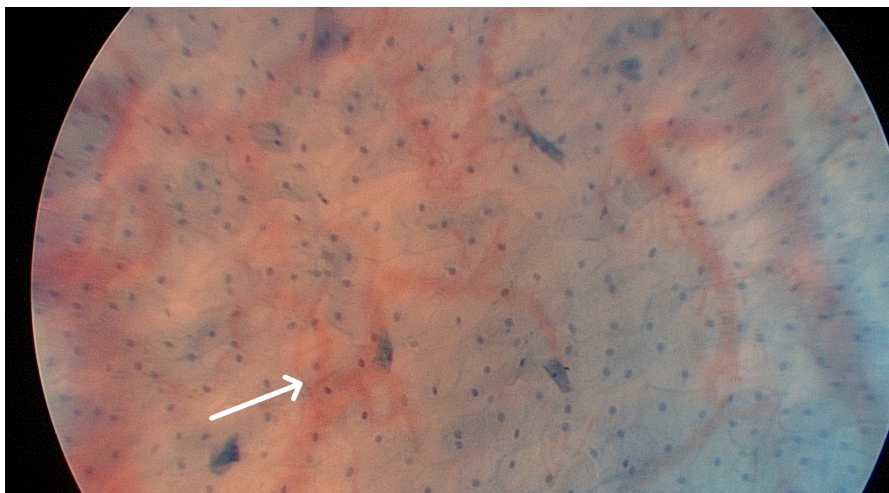


Fig. 27 - Endoscopia de contacto 60X. Microcirculação da mucosa do trígono retromolar. Observam-se vasos em ansa (seta) que são os ramos terminais de uma estrutura arboriforme. Observam-se algumas células coradas com núcleos de pequenas dimensões.

Observam-se *ostia* de glândulas semelhantes, morfológica e fisiologicamente aos da mucosa jugal (Fig. 28). Estas formações tem uma forma redonda, com um arranjo em espiral das células no seu interior. São normalmente de menores dimensões e são rodeadas por vasos em ansa com uma distribuição centrífuga em relação ao *ostium* (Fig. 28). A sua disposição na superfície da mucosa apresentou, no nosso estudo, uma maior densidade do que na mucosa jugal. Outra evidência da aparente existência de abundantes formações glandulares é o facto da auto limpeza do azul de metileno ser mais rápida do que na mucosa jugal.

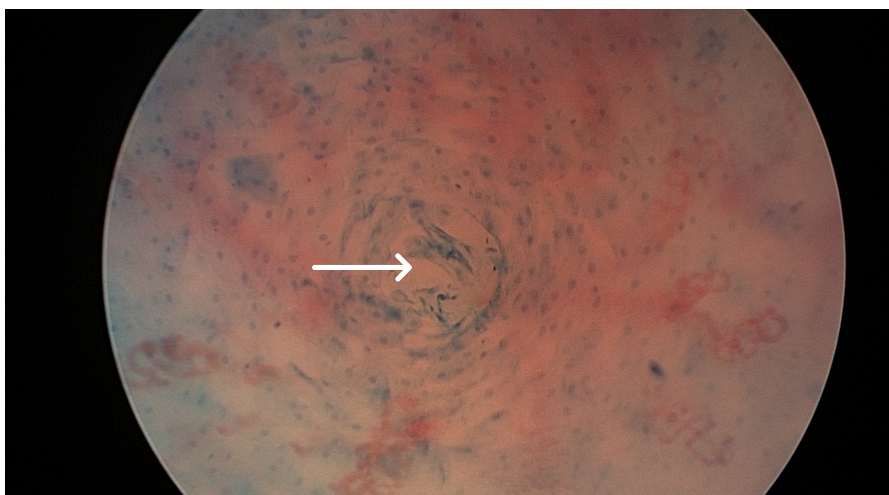


Fig. 28 - Endoscopia de contacto 60X. *Ostium* de glândula semi-aberto da mucosa do trígono retromolar (seta). Observa-se o aspecto espiralado do arranjo celular. Em torno do *ostium* observam-se ansas vasculares com distribuição regular.

## MUCOSA DO PAVIMENTO DA BOCA

A mucosa oral nesta localização é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado. Os limites das células são bem visíveis (Fig. 29) embora de forma menos nítida do que na face ventral da língua e na mucosa jugal. A forma das células é poligonal e as dimensões celulares são sobreponíveis em todas as células do epitélio do pavimento da boca observáveis por endoscopia de contacto (Fig. 29). O núcleo é picnótico embora ligeiramente maior do que os núcleos das células da mucosa jugal.

Existe grande abundância de vasos que são facilmente focados com o endoscópio de contacto, pois o epitélio é pouco espesso e não queratinizado. Estes vasos não se observam na forma de ansa provavelmente porque, devido à pequena espessura do epitélio, as papilas conjuntivas não são necessárias para assegurar a normal nutrição destas células. É assim possível observar as ramificações do aparelho microvascular sub epitelial com forma arboriforme e sem ansas nos ramos terminais (Fig. 29).

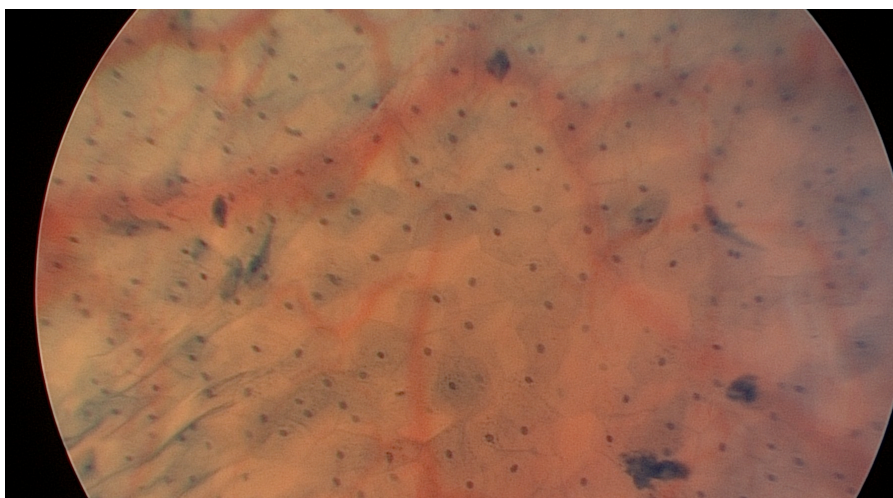


Fig. 29 - Endoscopia de contacto. Células epiteliais do pavimento da boca, com focagem intermédia entre o plano celular e vascular, permitindo observar células relativamente bem delimitadas e vasos dispostos de forma ramificada sem ansas típicas de outras localizações.

A mucosa apresenta micro-pregas abundantes (Fig. 30), possuindo uma orientação predominantemente paralela ao sulco gengival. Estas estruturas contribuem para a elasticidade e plasticidade da mucosa do pavimento da boca. As pregas facilitam o movimento de distensibilidade desta mucosa e garantem maior facilidade nos movimentos da língua na deglutição, na mastigação e na fala.

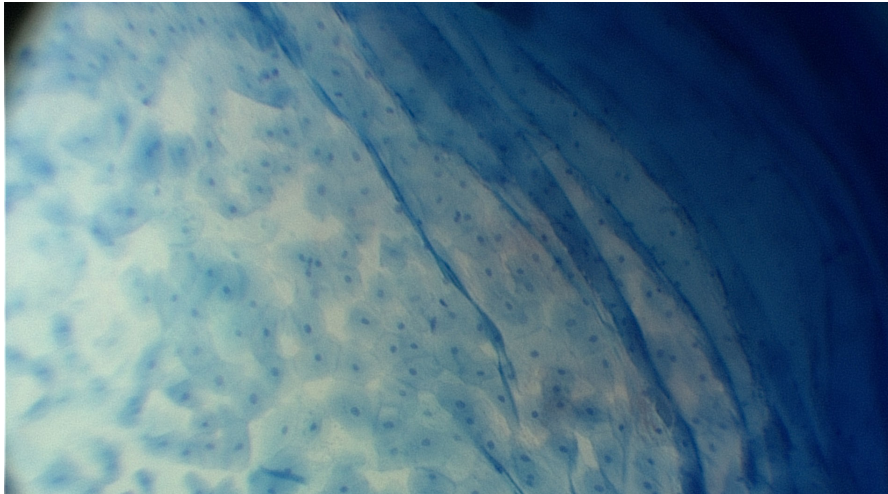


Fig. 30 - Endoscopia de contacto 60X. Micro-pregas epiteliais do pavimento da boca.

## MUCOSA DA FACE VENTRAL DA LÍNGUA

A face ventral da língua está coberta por uma mucosa de revestimento com epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado de espessura reduzida. As células apresentam limites citoplasmáticos relativamente bem delimitados, embora de forma menos evidente do que na mucosa jugal (Fig. 31).

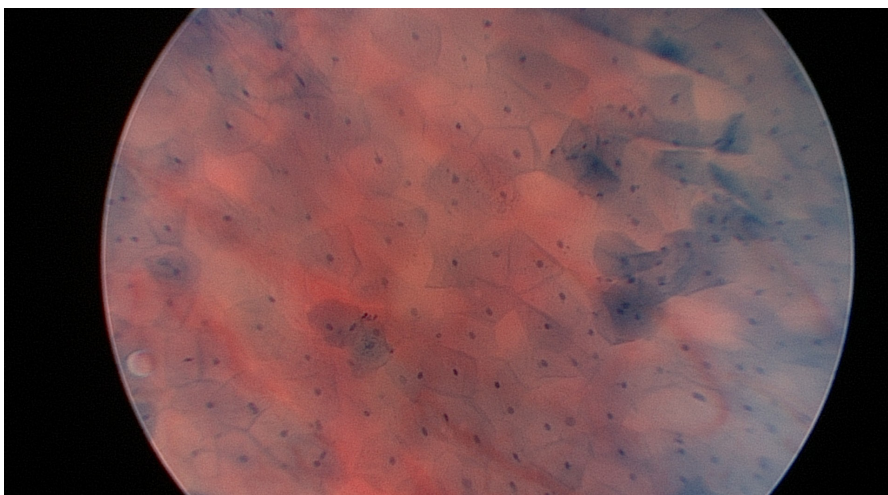


Fig. 31- Endoscopia de contacto 60X. Mucosa face ventral da língua. Destaca-se a boa limitação citoplasmática característica desta localização e da mucosa jugal.



Os núcleos têm dimensões ligeiramente superiores à dos núcleos picnóticos. Como consequência directa, a relação núcleo-citoplasma é baixa embora regular, pois todas as células apresentam dimensões totais e nucleares semelhantes. A membrana nuclear é linear e regular e a forma do núcleo é esferóide (Fig. 31).

O epitélio é pouco espesso nesta localização da mucosa oral. Este facto permite observar o conjuntivo subjacente e a sua rica microcirculação. A arquitectura vascular é densa, com vasos de grande diâmetro, de onde saem ramos que se entrecruzam terminando em forma de ansa (Fig. 32). A arquitectura vascular observada é semelhante à do trígono retromolar. Estes vasos de maior diâmetro são característicos de áreas de maior profundidade. Provavelmente existem noutras localizações podendo não ser visíveis pelo facto de o epitélio e a lâmina própria serem mais espessos.

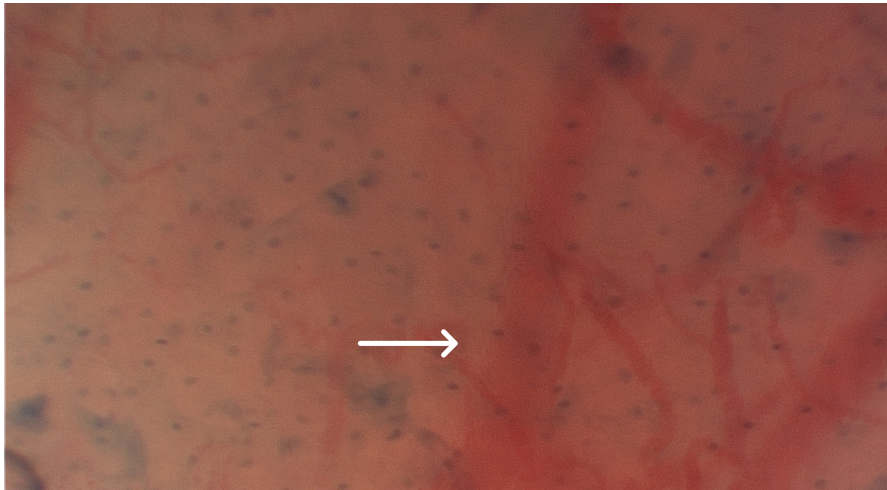


Fig. 32- Endoscopia de contacto 60X. Com focagem intermédia entre o plano celular e vascular permitindo observar células epiteliais e a microcirculação da face ventral da língua. Estas células têm limites relativamente bem definidos e núcleos um pouco maiores do que os das células da mucosa jugal. A microcirculação tem uma distribuição arboriforme, apresentando ansas vasculares nos ramos terminais (seta).

Observam-se múltiplas micro-pregas da mucosa com orientação paralela ao eixo maior da língua. Estas formações são longas e bastante densas, constituindo uma reserva de mucosa que facilita os movimentos da língua sem gerar tensão ou rotura (Fig. 33).

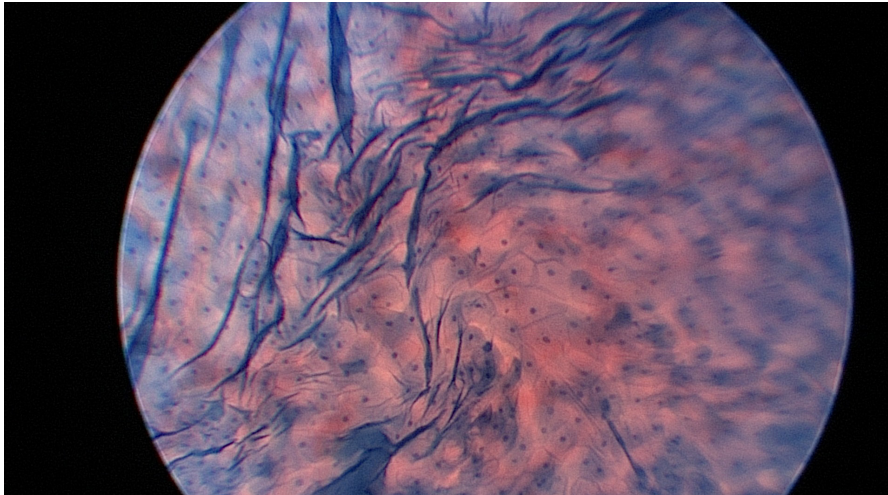


Fig. 33- Endoscopia de contacto face ventral da língua 60X. Observam-se micro-pregas epiteliais que servem de reserva de superfície para permitir os movimentos da língua sem rotura.

Este epitélio tem poucos *ostia* glandulares que são raramente visíveis com endoscopia de contacto. A mucosa está normalmente muito hidratada por assentar no pavimento da boca, que possui uma sub-mucosa muito rica em glândulas, não necessitando assim de ter muitas glândulas salivar minor. A auto lavagem do corante é lenta e mais demorada do que no pavimento da boca e na mucosa jugal.

## MUCOSA DA FACE DORSAL DA LÍNGUA

A mucosa da face dorsal da língua pertence à mucosa oral do tipo especializado com áreas de tipo mastigatório. A mucosa especializada é representada pelas papilas gustativas: filiformes, fungiformes, circunvaladas e foliáceas. As filiformes e as fungiformes são as mais abundantes (Fig. 34, 35, 36).



Fig. 34- Visão macroscópica do terço anterior da língua. Observam-se múltiplas papilas fungiformes (seta).

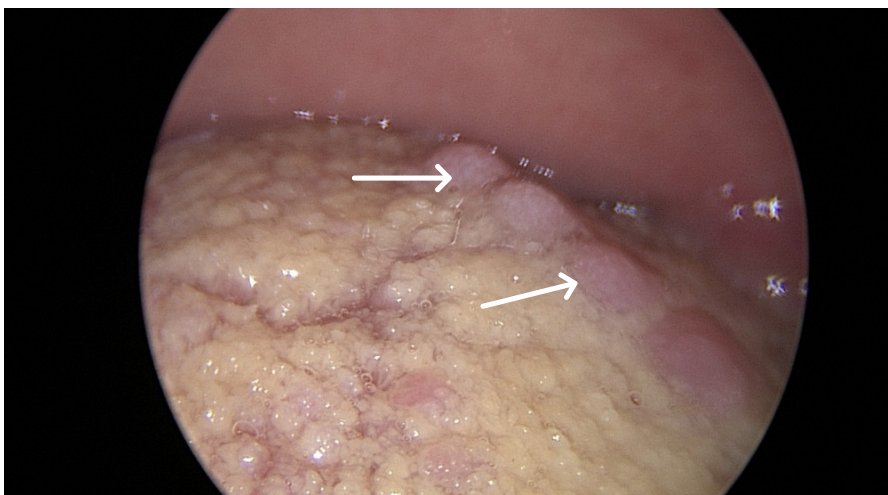


Fig. 35- Visão macroscópica do terço posterior da língua. Observam-se as papilas circunvaladas que no conjunto formam o V lingual (seta).

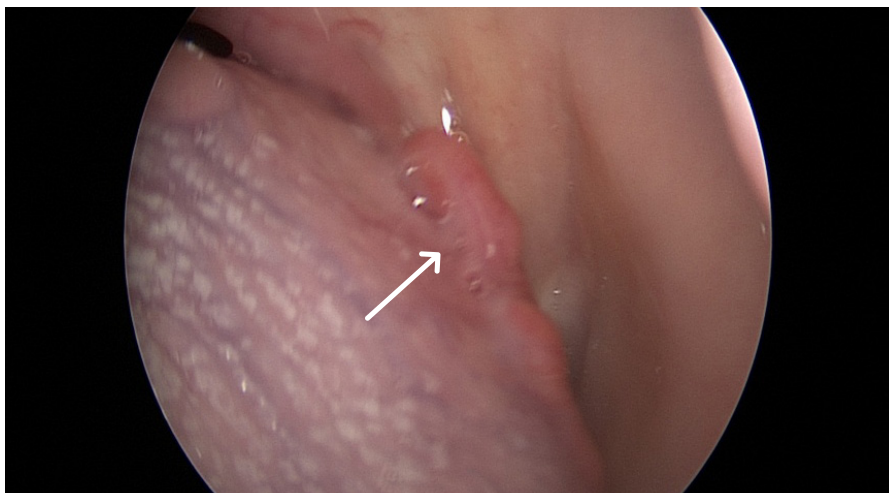


Fig. 36 - Visão macroscópica do terço posterior esquerdo da língua. Observam-se as papilas foliáceas, frequentemente difíceis de individualizar (seta)

A endoscopia de contacto permite observar as papilas da face dorsal da língua. Torna possível avaliar a sua morfologia normal e as possíveis deformações ou outras alterações. Podemos avaliar o grau de despapilação com grande exactidão, nomeadamente na avaliação de despapilação parcial *versus* despapilação completa (Fig. 37). Podemos ainda observar o epitélio e a microvascularização entre as papilas tal como nas outras regiões da mucosa oral.

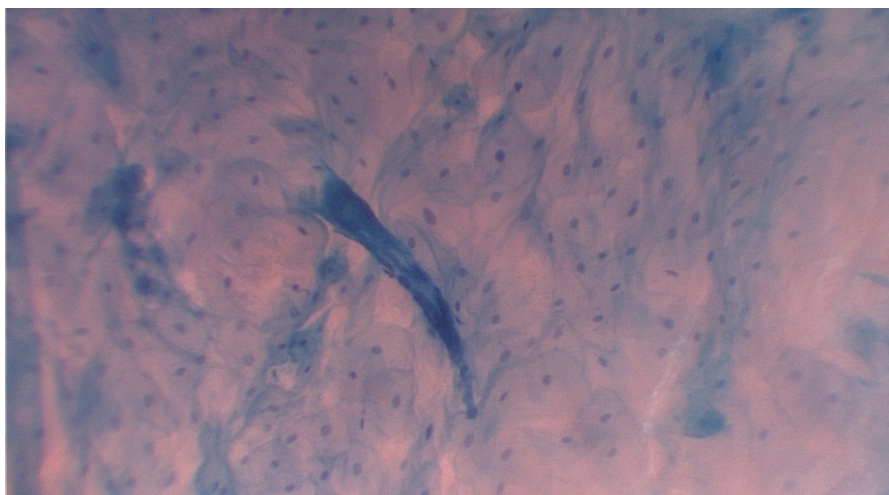


Fig. 37 - Endoscopia de contacto. Face dorsal da língua 60X. Observa-se área despapilada com apenas uma papila filiforme, rodeada por epitélio pavimentoso.

A face dorsal da língua é revestida por mucosa mastigatória e especializada. O epitélio mastigatório é do tipo ortoqueratósico ou paraqueratósico. O epitélio especializado das papilas varia com o seu tipo de papila (Fig. 38, 39). Na nossa população, ao contrário do



descrito, nunca observámos queratinização no epitélio interpapilar (Fig. 39). O epitélio foi sempre do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, ou eventualmente com algum grau de paraqueratinização não detectável por endoscopia de contacto (Fig. 39).

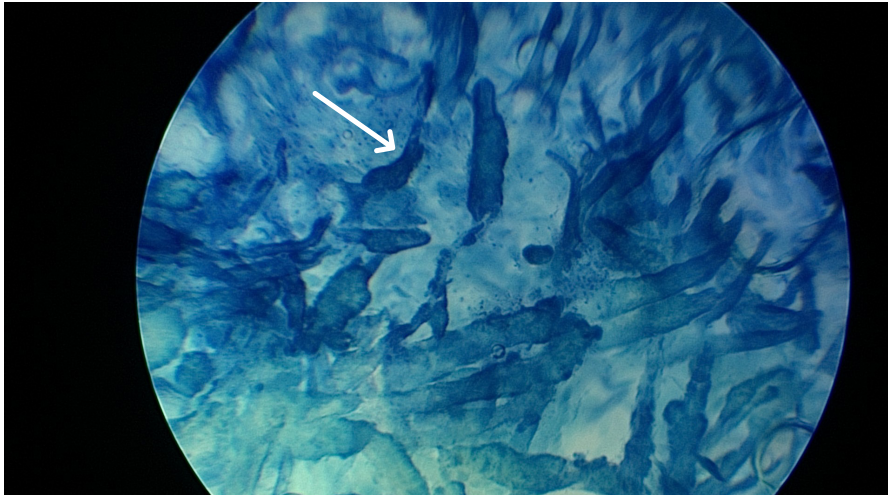


Fig. 38 - Endoscopia de contacto. Face dorsal da língua 60X. Observam-se papilas filiformes (seta) cobertas por epitélio queratinizado.

As papilas filiformes são as mais abundantes. Cobrem toda a superfície da face dorsal da língua atingindo os bordos línguais. São estruturas cuneiformes com o ápice orientado para a faringe (Fig. 38, 39). As papilas filiformes têm 2 a 3 mm de comprimento e são cobertas por um epitélio pavimentoso ortoqueratinizado.

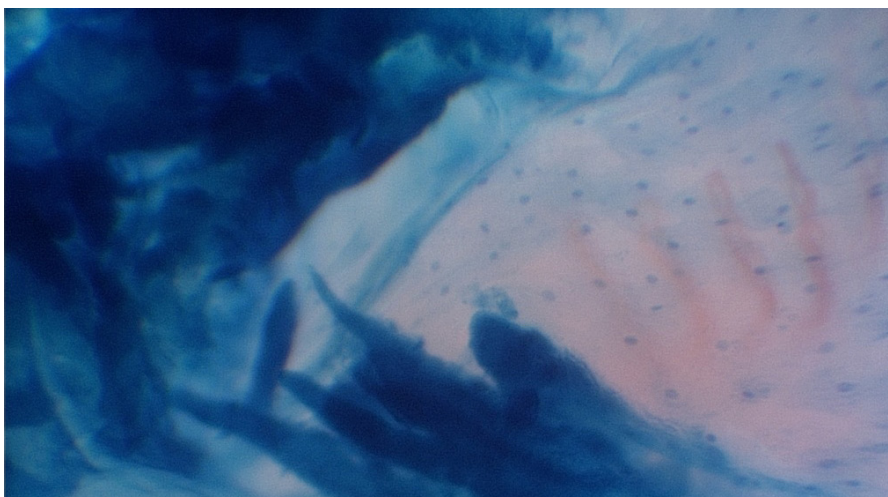


Fig. 39 - Endoscopia de contacto Face dorsal da língua 60X. Observa-se epitélio pavimentoso não queratinizado entre papilas. Um ponto de focagem intermédio em profundidade permite observar em simultâneo as células e a microcirculação em forma de ansa.



As papilas fungiformes têm cerca de 1 mm de comprimento e forma de cogumelo, como o nome sugere. São muito menos abundantes do que as papilas filiformes e localizam-se preferencialmente na extremidade anterior da língua, junto à ponta (Fig. 34). É normalmente possível observar os vasos sub epiteliais devido à pequena espessura do epitélio e devido à ausência de ortoqueratinização (Fig. 40).

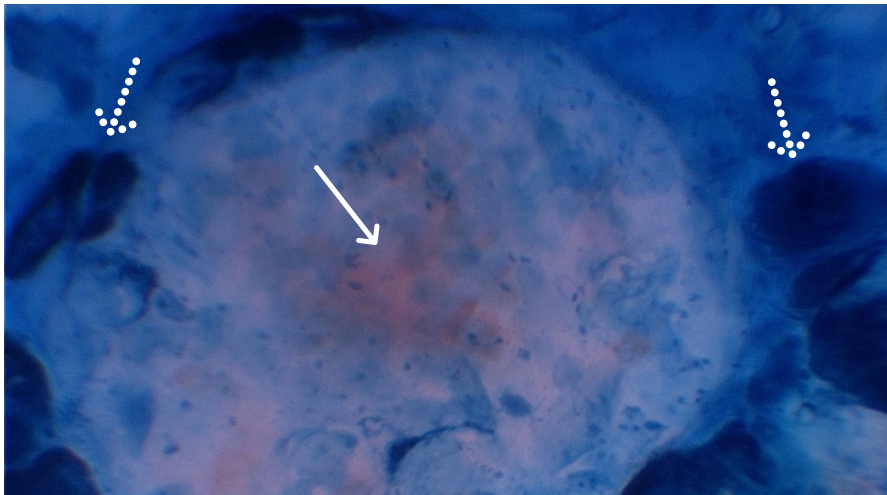


Fig. 40 - Endoscopia de contacto. Face dorsal da língua 60X. Papila fungiforme rodeada de papilas filiformes. Observa-se epitélio pavimentoso estratificado com ligeira queratose e vasos em forma de ansa sub-epitelial no eixo da papila fungiforme (seta). Nas áreas adjacentes é possível observar papilas filiformes (setas descontínuas).

As papilas circunvaladas encontram-se no V lingual. São cobertas por um epitélio ortoqueratinizado. Devido à sua localização, não são passíveis de estudo em ambiente de consulta com endoscopia de contacto, sendo necessária anestesia geral (Fig. 35).

As papilas foliáceas são pouco abundantes e localizam-se apenas na região posterior dos bordos linguais, podendo ser difíceis de individualizar macroscopicamente (Fig. 36).

## GENGIVA

A gengiva é revestida por mucosa mastigatória sujeita a stresse mecânico durante a mastigação. A mucosa é pouco espessa e cobre o osso alveolar que se apresenta por vezes irregular, o que dificulta o contacto completo da superfície da lente sobre a área a observar, com implicações na colheita da imagem (Fig. 41).

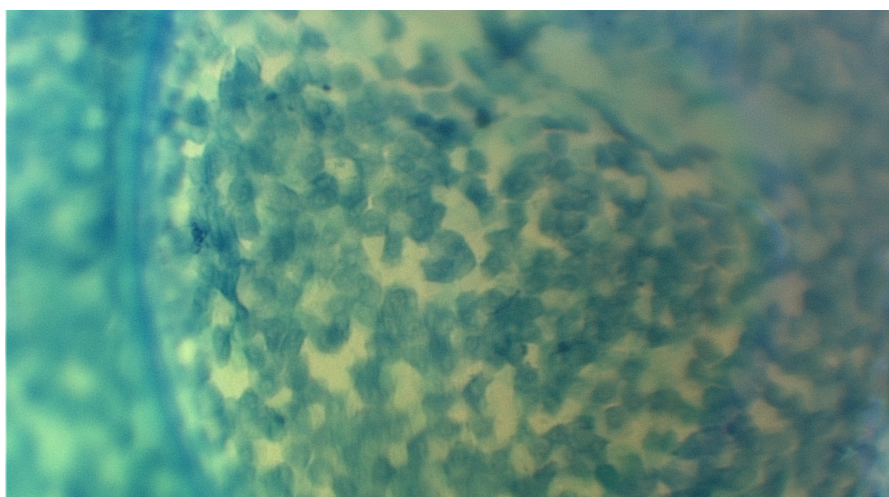


Fig. 41- Endoscopia de contacto, 60X. Mucosa da gengiva. A irregularidade da superfície da mucosa, devido a estar apoiada numa base óssea irregular, não permite observar as células em toda a extensão do campo óptico sugerindo que a lente está em contacto parcial com a mucosa. Observam-se células totalmente queratinizadas sem núcleo visível, mantendo um padrão homogéneo por as células terem forma e dimensões semelhantes.

Esta área apresentou-se no nosso estudo com células queratinizadas em mais de dois terços dos casos, observando-se núcleos nas restantes. Muitas vezes é possível observar células inflamatórias a infiltrar o epitélio (Fig. 42).

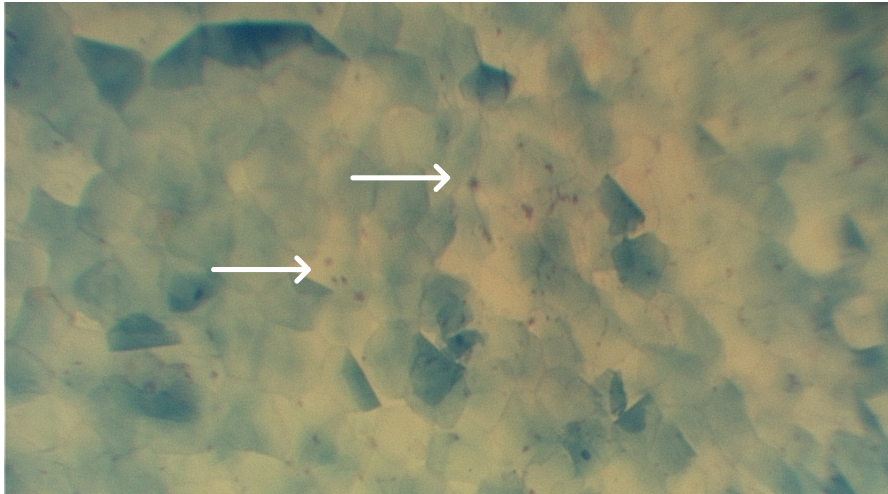


Fig. 42- Endoscopia de contacto, 60X. Mucosa da gengiva, área mais próxima de peça dentária. Células sem núcleo totalmente queratinizadas. Observam-se células inflamatórias a infiltrar a mucosa (setas).

A área da mucosa da gengiva mais afastada dos dentes apresenta menos hiperqueratose. Não há uma linha de separação bem definida mas gradualmente vão aparecendo com mais frequência células com núcleos visíveis (Fig. 43).

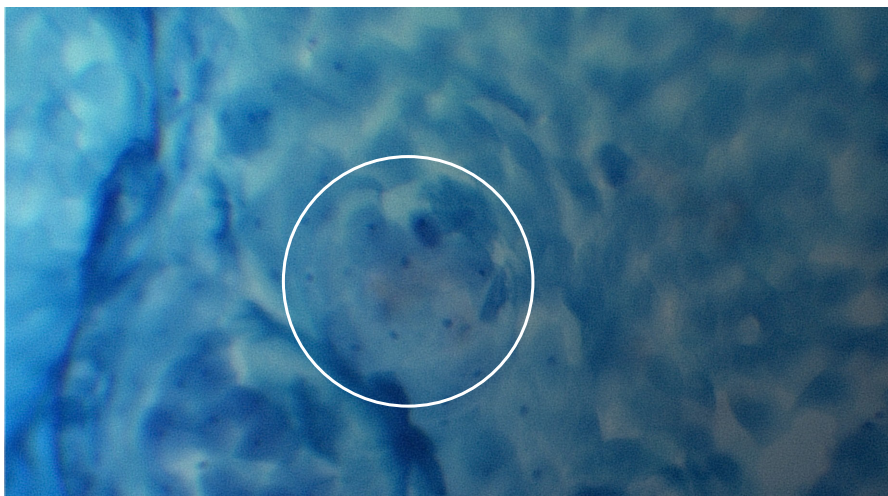


Fig. 43 - Endoscopia de contacto 60X. Mucosa da gengiva. Observa-se área superior com células sem núcleo visível sugerindo ortoqueratose. Na região inferior, mais afastada do dente, já se observam células nucleadas (círculo).

Devido à grande espessura do epitélio e à queratose pode não ser possível observar a microvascularização. Os vasos são mais fáceis de observar na área não-queratótica da mucosa da gengiva. A microvascularização é tipicamente do tipo papilar com ansas relativamente curtas, de pequeno diâmetro e de grande densidade por unidade de superfície (Fig. 44).

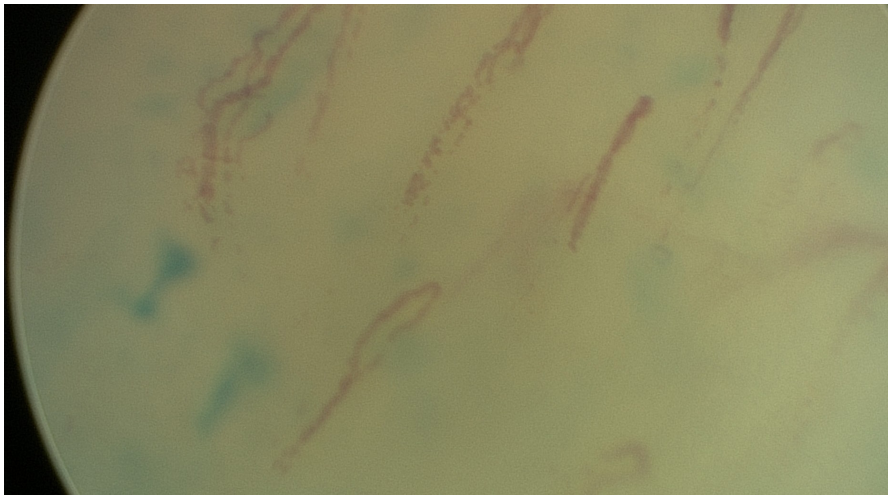


Fig.44- Endoscopia de contacto, 60X. Mucosa da gengiva, área mais afastada do dente, denominada mucosa alveolar. Observam-se vasos em ansa curta e de pequeno diâmetro. Note-se nas papilas mais superiores da imagem os contornos descontínuos do vaso, consequência de ligeiro aumento de pressão da ponta do endoscópio nesse ponto.

# DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

## POPULAÇÃO DO ESTUDO - CARACTERIZAÇÃO

A observação por endoscopia de contacto foi realizada na mucosa oral em 148 casos de lesões persistentes de duração superior a 3 semanas. Registaram-se 31 (20,9%) lesões clinicamente malignas, 86 (58,1%) lesões clinicamente potencialmente malignas e 31 (20,9%) lesões clinicamente benignas. Os indivíduos portadores das lesões tinham idades compreendidas entre os 18 e os 84 anos, dos quais 44,6% (66) pertenciam ao sexo feminino e 55,4% (82) ao sexo masculino (Gráfico 1).

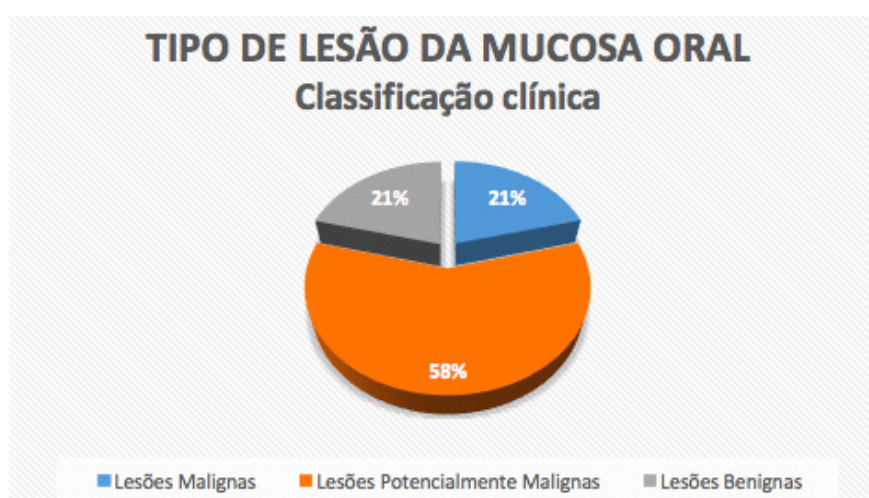
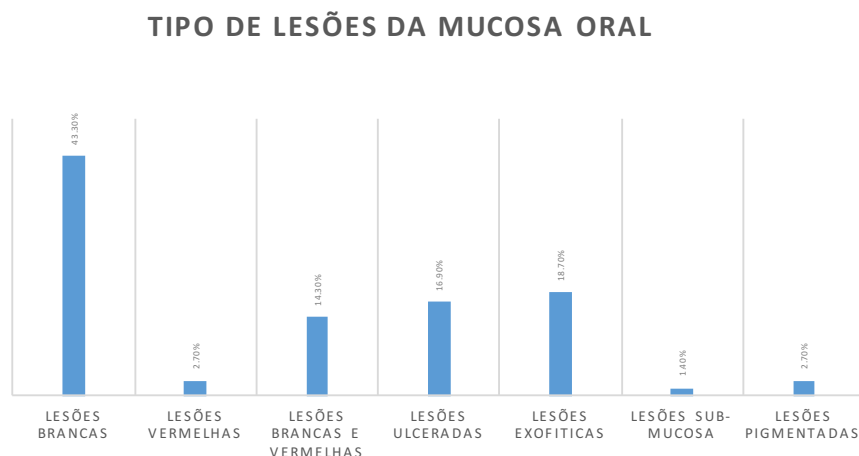


Gráfico 1

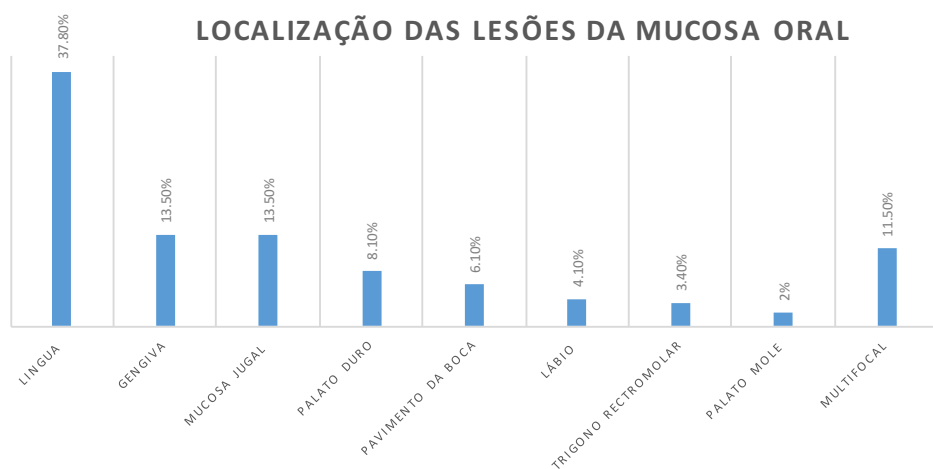


Estas lesões agruparam-se quanto ao aspecto macroscópico, nos seguintes tipos: lesões brancas 43,3%, lesões vermelhas 2,7%, lesões brancas e vermelhas 14,3%, lesões ulceradas e infiltrativas 16,9%, lesões exofíticas 18,7%, lesões submucosas 1,4% e lesões pigmentadas 2,7% (Gráfico 2).



**Gráfico 2**

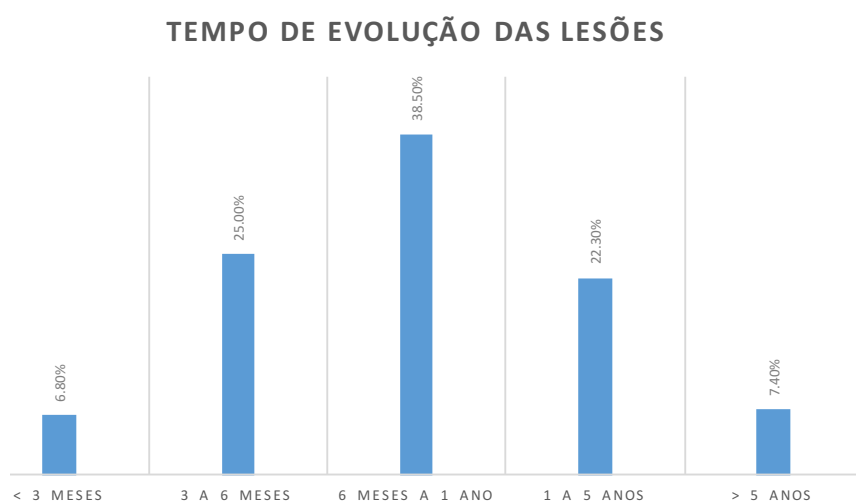
As lesões estudadas apresentavam a seguinte localização na boca: língua – 37,8%; gengiva – 13,5%; mucosa jugal – 13,5%; palato duro – 8,1%; pavimento da boca – 6,1%; lábio – 4,1%; trígono retromolar – 3,4%; palato mole – 2,0%; e em 11,5% eram lesões multifocais sem predomínio de localização (Gráfico 3).



**Gráfico 3**

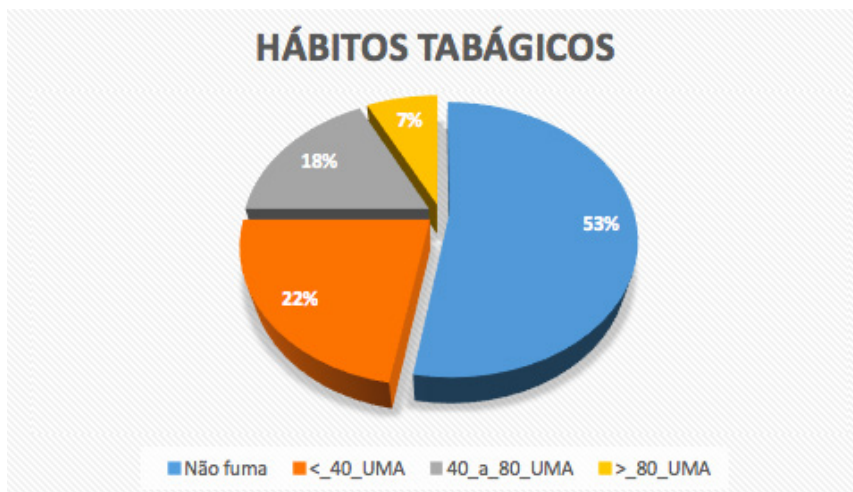


Verificámos que 98 (66,2%) lesões eram sintomáticas durante algum período da evolução e 50 (33,8%) lesões, eram completamente assintomáticas. O tempo de evolução aparente destas lesões aquando do primeiro diagnóstico variou entre as três semanas e os 14 anos; considerámos vários intervalos temporais e verificámos que 38,5% (57) das lesões foram diagnosticadas entre os 6 e os 12 meses de evolução e 29,7% (44) foram diagnosticadas com mais de 1 ano de evolução. No entanto, cerca de 90% eram benignas e as restantes potencialmente malignas. As lesões malignas, em nenhum caso, ultrapassaram 1 ano de evolução desde o início das queixas ou da sua percepção pelo portador (Gráfico 4).



**Gráfico 4**

Entre os indivíduos portadores das lesões estudadas 52,7% (78) eram não fumadores e 47,3% (70) fumadores (Gráfico 4). Entre os não fumadores 16,9% (25) eram ex-fumadores, tendo 6,8% (10) abandonado o hábito de fumar há mais de 10 anos e 10,1% (15) há menos de 10 anos (Gráfico 5).



**Gráfico 5**

Entre os doentes portadores de lesões 54,1% (80) não tinham hábitos alcoólicos e 45,9% (68) tinham hábitos alcoólicos, prevalecendo entre estes o grau moderado 57,4% (39) (Gráfico 6).



**Gráfico 6**

A saúde dentária é igualmente um dado importante para a avaliação destas lesões. Na população que constitui esta amostra 45,9% (68) não aparentavam boa saúde dentária e 54,1% (80) exibiam uma aparente boa saúde dentária. Em relação à existência de traumatismos crónicos da mucosa oral, observados ou descritos pelo doente, 21,6% (32) dos casos referiam traumatismos crónicos, normalmente, por peças dentárias ou próteses.

## DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

A observação por endoscopia de contacto permitiu obter informação a nível celular e vascular em todos os doentes. Algumas lesões forneceram mais informações sobre as células, enquanto que em outras, a informação obtida centrou-se mais na microcirculação. Algumas lesões ulceradas ou de carácter mais friável condicionaram o aparecimento de pequenas quantidades de sangue no campo de observação. Ainda assim, não ocorreu nenhum caso de hemorragia com necessidade de medidas de hemóstase por sutura ou cauterização eléctrica. Nenhum doente fez qualquer tipo de reacção alérgica, local ou sistémica. Não foi necessário interromper nenhum procedimento por intolerância do doente ou por outra causa. Não se registaram queixas significativas de dor, hemorragia ou lesões traumáticas nas 48 horas após a realização do exame.

O diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto, tomando o diagnóstico anatomopatológico como teste padrão de referência, demonstrou uma boa capacidade discriminativa representada pelos seguintes valores: sensibilidade de 0.967 intervalo de confiança (IC 95% 0,833-0,994); especificidade de 0.975 (IC 95% 0,928-0,991), valor preditivo do positivo de 0,906 (IC 95% 0,758-0,968) e valor preditivo do negativo de 0,991 (IC 95% 0,953-0,998), associado a uma razão de verosimilhança do positivo de 38,022, uma razão de verosimilhança do negativo de 0,03 e com uma exactidão de 0,973 (IC 95% 0,933-0,989). A análise de concordância - índice Kappa - entre o diagnóstico por endoscopia de contacto e o diagnóstico por anatomopatologia da biópsia revelou um índice de concordância Kappa muito elevado - 0.908 ( $p < 0,001$ ) - tabela de Landis JR e Koch GG (Tab.1).

**Comparação do diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto  
com diagnóstico anatomopatológico de biópsia**

	Sensibilidade	Especificidade	Razão de verosimilhança do negativo	Razão de verosimilhança do positivo	Valor preditivo do positivo	Valor preditivo do negativo	Exactidão	Índice de concordância Kappa
Diagnóstico por endoscopia de contacto	0.967 (0,83-0,99)	0.975 (0,92-0,99)	0,03	38,022	0.906 (0,75-0,96)	0.991 (0,95-0,99)	0.973 (0,93-0,98)	0,908 $P < 0,001$

**Tabela 1**

Registaram-se 3 falsos positivos e 1 falso negativo. No entanto, quando comparamos este resultado com o diagnóstico anatomopatológico da peça operatória, passa a existir só um falso positivo e mantém-se um falso negativo.

A capacidade diagnóstica da clínica e da endoscopia de contacto na detecção de malignidade, quando comparadas entre si, revelam valores muito elevados de sensibilidade de 1 (IC 95% 0,891-1) e de especificidade de 0,991 (IC 95% 0,953-0,998) bem como um valor preditivo do positivo de 0,969 (IC 95% 0,843-0,994), um valor preditivo do negativo de 1 (IC 95% 0,968-1) e uma exactidão de 0,993 (IC 95% 0,963-0,999). A razão de verosimilhança do positivo é de 117 (Tab. 2).

**Comparação do diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto com diagnóstico clínico**

	Sensibilidade	Especificidade	Razão de verosimilhança do positivo	Valor preditivo do positivo	Valor preditivo do negativo	Exactidão
Diagnóstico por endoscopia de contacto	1 (0,89-1)	0,991 (0,95-0,99)	117	0,969 (0,84-0,99)	1 (0,97-1)	0,993 (0,96-0,99)

**Tabela 2**

Estes resultados demonstram a capacidade da endoscopia de contacto para diagnosticar malignidade e confirmam os resultados da maioria dos trabalhos publicados. A fase seguinte do estudo centrou-se nos critérios e nos parâmetros usados para definir o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.

## PADRÃO CELULAR DE MALIGNIDADE

As alterações ou achados celulares que considerámos úteis para definir o padrão de malignidade, podem dividir-se em avaliação geral ou tecidular e avaliação citológica.

O aspecto geral é representado pela identificação de heterogeneidade celular no campo óptico. Este aspecto é formado pela existência de células com núcleo de diferente dimensão, forma (anisocariose) e coloração (anisocromia). Na avaliação celular individualizada consideraram-se como achados celulares importantes a existência de um núcleo de forma irregular, a relação núcleo-citoplasma alterada e irregular, a alteração da coloração nuclear com aumento e grande variabilidade da sua intensidade, a observação de nucléolos, a observação de mitoses e a existência de hiperqueratose (células anucleadas) heterogénea e amorfa, sem definição dos limites celulares. Estas alterações celulares em conjunto, permitiram o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. No entanto, individualmente apresentaram diferentes valores de sensibilidade, especificidade e exactidão (Tab. 3)

	Sensibilidade	Especificidade	Razão de verosimilhança do positivo	Índice Kappa	Valor preditivo do positivo	Valor preditivo do negativo	Exactidão
heterogeneidade celular (C1)	0,967 (0,83-0,99)	0,975 (0,92-0,99)	38,02	0,922 P<0,001	0,906 (0,75-0,96)	0,991 (0,95-0,99)	0,973 (0,93-0,98)
núcleos de forma irregular (C2)	0,967 (0,83-0,99)	0,975 (0,92-0,99)	38,22	0,922 P<0,001	0,906 (0,75-0,96)	0,991 (0,95-0,99)	0,973 (0,93-0,98)
alteração de coloração irregular (C3)	0,967 (0,83-0,99)	0,754 (0,66-0,82)	3,93	0,553 P<0,001	0,500 (0,37-0,62)	0,989 (0,94-0,99)	0,797 (0,72-0,85)
alteração de relação núcleo/citoplasma irregular (C4)	0,967 (0,83-0,99)	0,975 (0,92-0,99)	38,02	0,922 P<0,001	0,906 (0,75-0,96)	0,991 (0,95-0,99)	0,973 (0,93-0,98)
mitoses visíveis (i)	0,967 (0,83-0,99)	0,797 (0,71-0,85)	4,75	0,587 P<0,001	0,577 (0,41-0,67)	0,989 (0,94-0,99)	0,831 (0,76-0,88)
nucléolos visíveis (i)	0,967 (0,83-0,99)	0,737 (0,65-0,80)	3,68	0,493 P<0,001	0,483 (0,36-0,60)	0,989 (0,93-0,99)	0,784 (0,71-0,84)
hiperqueratose irregular (C7)	1 (0,83-1)	0,931 (0,84-0,97)	14,4	0,912 P<0,001	0,800 (0,60-0,91)	1 (0,94-1)	0,946 (0,87-0,97)

**Tabela 3**

A observação por endoscopia de contacto deve obedecer a um protocolo que define o tipo de achados celulares e vasculares a observar, qual a sua sequência e qual importância para atingir o diagnóstico final.

Quando começamos a observação microscópica com o endoscópio de contacto focamos o plano celular e avaliamos se a imagem é homogénea em todo o campo óptico. Não existindo alterações celulares (Fig.1) podemos continuar a mover o endoscópio para uma área vizinha e continuar o rastreio da mucosa (fluxograma 1). Quando pretendermos efectuar outro tipo de diagnóstico ou avaliar as características destas células, então devemos parar de mover o endoscópio por um momento, observar e, eventualmente, aumentar o zoom ou passar para a ampliação de 150 aumentos.

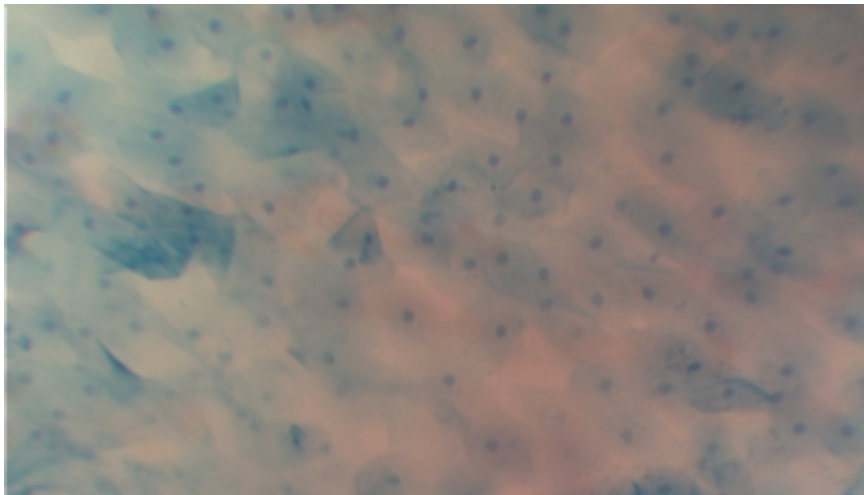


Fig. 1- Endoscopia de contacto 60X. Padrão de homogeneidade celular com células com núcleos de forma, dimensão e coloração semelhantes no mesmo campo óptico (eucariose).



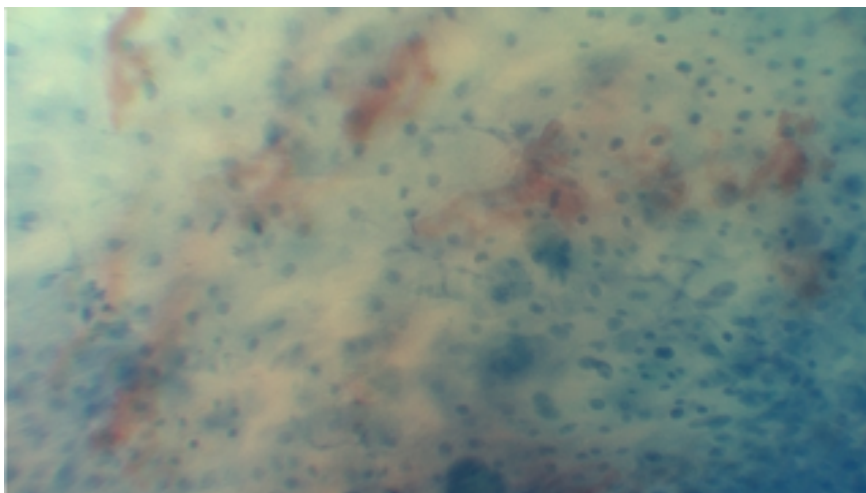


Fig. 2- Endoscopia de contacto 60X. Padrão de heterogeneidade celular com células com núcleos de forma, dimensão e coloração diferentes no mesmo campo óptico (anisocariase).

## HETEROGENEIDADE CELULAR

Se o aspecto geral é de heterogeneidade real (Fig. 2) e não apenas uma heterogeneidade pontual, um artefacto (provocado por uma coloração deficiente ou excessiva, um excesso de secreções ou ainda traumatismo iatrogénico causado pela ponta do endoscópio), então estamos, muito provavelmente, perante um diagnóstico de malignidade.

Esta noção é suportada pelos resultados com sensibilidade de 0,967 (IC 95% 0,833-0,994) e de especificidade de 0,975 (IC 95% 0,928-0,991) para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. O factor preditivo do positivo é de 0,906 (IC 95% 0,758-0,968) e o factor preditivo do negativo de 0,991 (IC 95% 0,953-0,998) e uma exactidão de 0,973 (IC 95% 0,933-0,989), associada a uma razão de verosimilhança de 38,02 e a uma análise de concordância entre a observação de heterogeneidade celular por endoscopia de contacto e o diagnóstico de malignidade com um índice Kappa de 0,922  $p < 0,001$  considerado muito elevado, quase concordância absoluta de acordo com a tabela de Landis JR e Koch GG.

Todos os doentes com diagnóstico de malignidade apresentavam aspectos de heterogeneidade celular no exame por endoscopia de contacto.

Após ser detectada heterogeneidade celular, equivalente a grande suspeita de malignidade, devemos passar à fase seguinte de avaliação individual da célula. Para o conseguirmos devemos aumentar o zoom da câmara ou passar para 150 aumentos. Recomenda-se começar por aumentar o zoom para a ampliação de 60 aumentos (Fig.3).

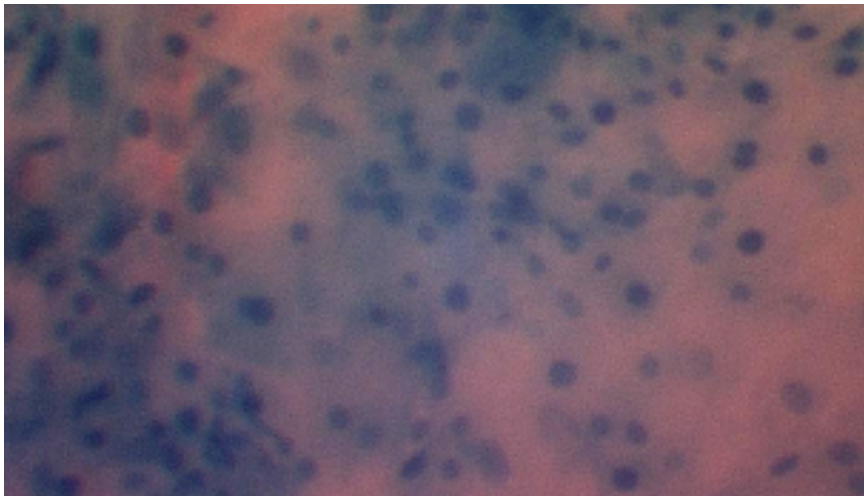


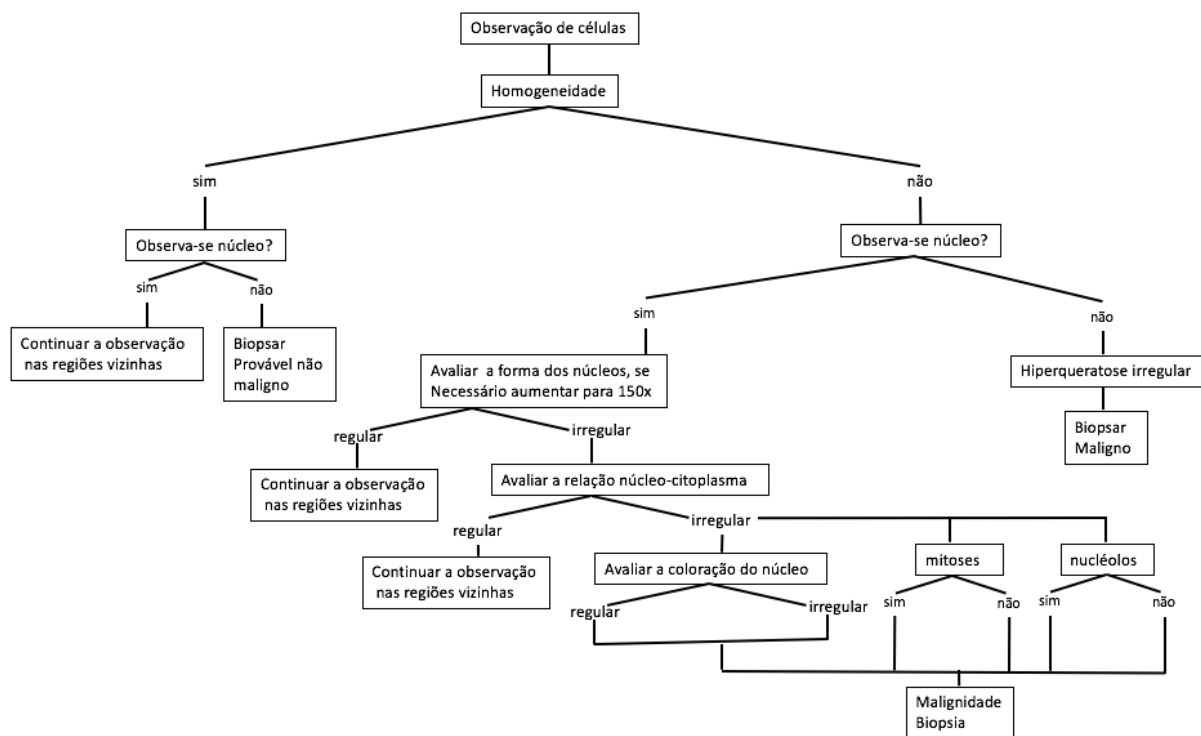
Fig. 3- Endoscopia de contacto 60X com zoom máximo. Padrão de heterogeneidade celular. Com maior ampliação é ainda possível manter uma imagem de conjunto para determinar a existência de heterogeneidade e simultaneamente estudar a forma, as dimensões, a coloração e os limites dos núcleos. Avalia-se a relação núcleo-citoplasma e a existência de nucléolos e mitoses.

A primeira questão que queremos ver respondida neste observação citológica é a seguinte: conseguimos observar os núcleos das células? (Flux. 1)

Se a resposta é sim, então estamos aptos a avaliar vários aspectos celulares que consideramos importantes para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. Discriminamos em seguida esses achados celulares ou factores celulares, que diferenciamos em major e minor consoante a sua importância relativa, e que permitem estabelecer o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.

## ACHADOS OU FACTORES CELULARES DIAGNÓSTICOS:

- O aspecto geral tecidual de heterogeneidade
- A forma, dimensão e limites do núcleo
- A regularidade da relação núcleo/citoplasma
- A intensidade e a regularidade da coloração nuclear
- A identificação de nucléolos
- A identificação de mitoses
- A presença de hiperqueratose irregular e heterogénea



Fluxograma 1 – Árvore de decisão para diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto e para determinação de que área da mucosa biopsar.

Começámos por avaliar a consistência interna dos achados celulares na sua globalidade e a sua validade diagnóstica em grupo. O resultado foi um índice alfa de Cronbach de 0,948 que se considera muito elevado. Para avaliar a sua consistência enquanto grupo e se a sua eficiência melhoraria com a remoção de algum dos factores celulares do grupo diagnóstico, testámos o “Cronbach’s alpha if item deleted” que revelou que não existiria vantagem em remover nenhum dos factores pois o índice de diagnóstico nunca melhorava, piorando sempre muito ligeiramente, excepto com a remoção do factor alteração da coloração em que melhorava 0,001, o que não é igualmente significativo (Tab. 4).

	Cronbach’s Alpha if Item Deleted
Heterogeneidade celular	0,919
Dismorfismo nuclear	0,919
Discromasia nuclear	0,949
Alteração da relação núcleo-citoplasma	0,919
Mitoses	0,928
Nucléolos	0,941
Hiperqueratose heterogénea	0,915

**Tabela 4**

Depois de garantido que estes factores celulares, em grupo possuem uma boa capacidade para realizar um diagnóstico de malignidade (coeficiente alfa de Cronbach), testámos a classificação dos achados celulares entre si e verificámos que são significativamente diferentes (Cochran’s Q <0,001). Feitas as comparações múltiplas com correcção de Bonferroni, conclui-se que os achados celulares mais distintos e responsáveis pela rejeição da igualdade são: a alteração da coloração do núcleo, a observação de nucléolos e a observação de mitoses.

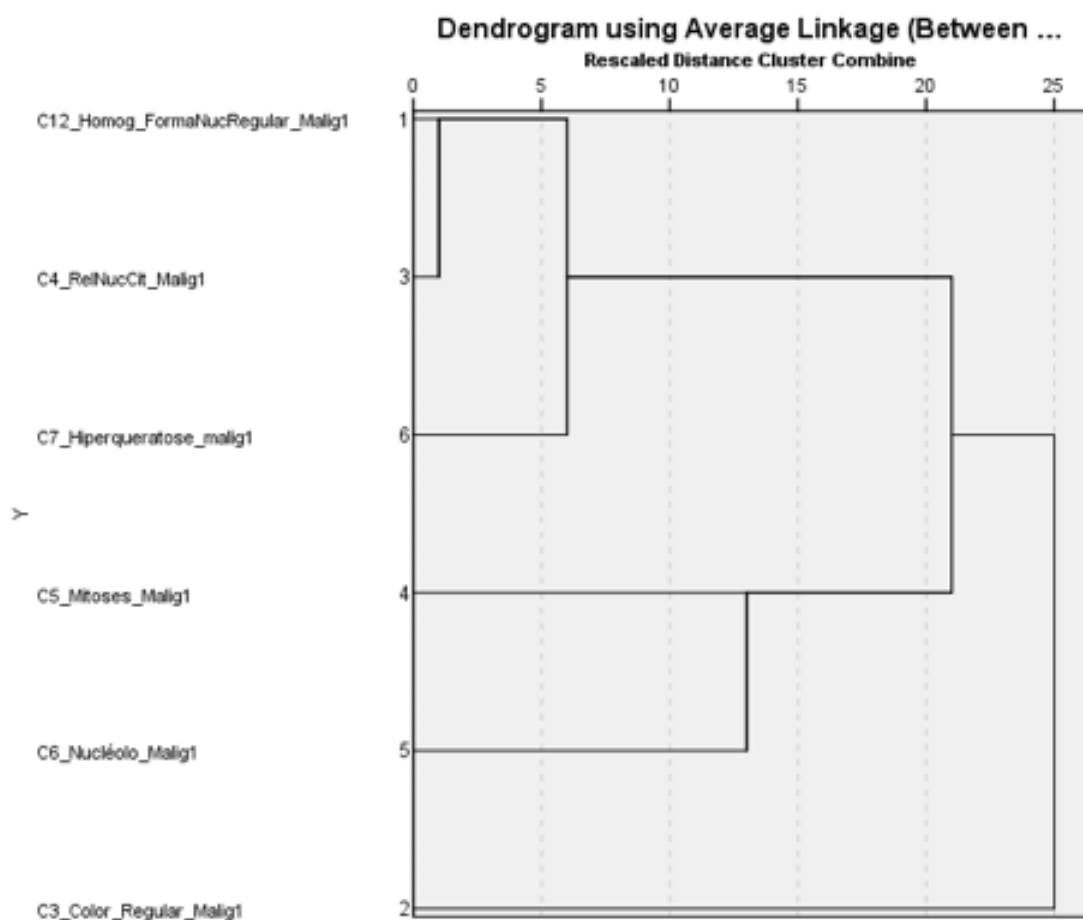
Para avaliar a importância relativa destes factores celulares e a sua inter-relação realizámos uma análise de *clusters*, que nos mostrou a existência de 3 *clusters*.

O primeiro *cluster* é formado por 4 factores celulares: a heterogeneidade tecidual geral,

a existência de núcleos de forma alterada, a alteração da relação núcleo/citoplasma e a existência de hiperqueratose irregular ou heterogênea (Tab. 4).

O segundo *cluster* é formado por 2 factores celulares: a existência de mitoses e a observação de nucléolos.

O terceiro *cluster* é formado apenas por 1 factor celular: o aumento irregular da coloração nuclear (Tab. 5).



**Tabela 5**

Os resultados anteriores e a experiência clínica suportam a vantagem da avaliação de todos aqueles factores ou achados celulares, quer individualmente quer em conjunto. Estes, devem ser observados e avaliados em sequência, de acordo com o definido na árvore de decisão (fluxograma 1) e com os resultados obtidos, quer sobre sua capacidade discriminativa para o diagnóstico de malignidade (sensibilidade, especificidade, razão de verosimilhança do positivo e do negativo), quer sobre a sua capacidade preditiva para o diagnóstico de malignidade (valor preditivo do positivo e negativo e exactidão), quer pelo seu índice de concordância Kappa.

Comparar a capacidade de detecção de cada um destes factores celulares e o diagnóstico de malignidade por exame anatomopatológico, possibilitou-nos confirmar as teorias de teor subjectivo que possuíamos sobre a importância relativa de cada um daqueles factores para o diagnóstico. Esta concordância, entre a nossa opinião empírica e baseada na nossa experiência e os resultados objectivos deste estudo, permitiu-nos sugerir a definição de factores major e factores minor de diagnóstico.

#### FACTORES OU ACHADOS CELULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO:

##### **FACTORES MAJOR**

- Heterogeneidade geral tecidular
- Forma e dimensão dos núcleos alteradas
- Relação núcleo/citoplasma alterada e irregular
- Hiperqueratose irregular e heterogénea

##### **FACTORES MINOR**

- Observação de mitoses
- Observação de nucléolos
- Aumento e irregularidade da coloração nuclear



## FORMA E DIMENSÃO DO NÚCLEO

Começando por avaliar a forma nuclear, nos casos de malignidade, os núcleos apresentam uma morfologia diferente do considerado normal podendo ter uma forma tipo fibroblasto (fusiforme) ou, mais frequentemente, uma forma aberrante e muito variável. A dimensão do núcleo é também muito variável, na maior parte dos casos superior ao normal e a membrana nuclear deixa de ser uma linha regular. No mesmo campo óptico, é possível observar núcleos picnóticos e núcleos de dimensões muito superiores ao normal (Fig. 3, 4).

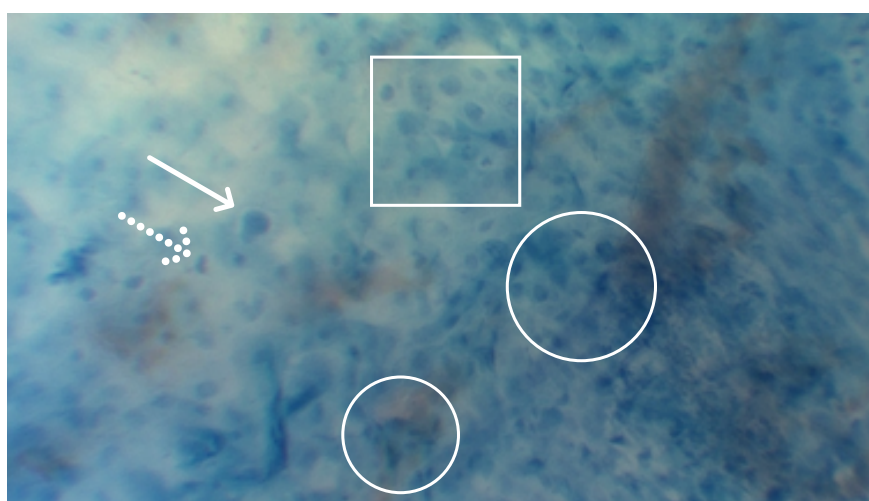


Fig. 4 - Endoscopia de contacto 60X. Observam-se núcleos com dimensões aumentadas (seta) e com forma irregular (seta descontinua). Algumas destas células atípicas distribuem-se em pequenos *clusters* (círculo). Algumas células apresentam nucléolos visíveis (quadrado).

Estas células com núcleos atípicos podem aparecer agrupadas em pequenos grupos num ambiente de células atípicas (Fig. 4) ou num ambiente de hiperqueratose. A associação destas células em pequenos grupos potencia a importância das alterações morfológicas no limite do normal, sendo o grau de suspeita de malignidade maior do que nos casos em que células com morfologia semelhante se encontrem isoladas e não agrupadas e com disposição regular.

Os resultados da sensibilidade, especificidade e exactidão em relação ao diagnóstico de malignidade são sobreponíveis aos da existência de heterogeneidade celular. Nomeadamente, uma sensibilidade de 0,967 (IC 95% 0,833-0,994) e uma especificidade

de 0,975 (IC 95% 0,928-0,991) para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. O factor preditivo do positivo de 0,906 (IC 95% 0,758-0,968) e o factor preditivo do negativo de 0,991 (IC 95% 0,953-0,998) e uma exactidão de 0,973 (IC 95%: 0,933-0,989), associado a uma razão de verosimilhança de 38,22 e uma análise de concordância K entre a existência de núcleos de forma alterada e muito variável e o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto de Kappa 0,922  $p < 0,001$ , que é considerado muito elevado, representando uma concordância quase absoluta (tabela de Landis JR e Koch GG).

## COLORAÇÃO NUCLEAR

A intensidade da coloração do núcleo no padrão celular de malignidade está aumentada, apresentando também uma grande variabilidade (discromasia).

A detecção de núcleos com coloração irregular apresentou nos resultados deste estudo valores elevados de sensibilidade 0,967 (IC 95% 0,833-0,994), mas baixos valores de especificidade 0,754 (IC 95% 0,669-0,823) e intervalos mais amplos. O valor preditivo do positivo foi bastante inferior ao dos factores anteriores com apenas 0,500 (IC 95% 0,375-0,625) a contrastar com um valor preditivo do negativo muito alto de 0,989 (IC 95% 0,940-0,998) e com um intervalo muito reduzido. A razão de verosimilhança do positivo é relativamente baixa 3,933. A exactidão foi de 0,797 (IC 95% 0,725-0,854). O resultado do índice de concordância kappa foi de 0,553  $p < 0,001$ , significando uma concordância moderada segundo a tabela de Landis JR e Koch GG, representando ainda assim um bom resultado, embora inferior ao obtido para os achados celulares considerados major.

O aumento da intensidade da coloração dos núcleos não ocorre exclusivamente nas situações de malignidade. Nos casos de inflamação crónica também observámos células constituídas por um núcleo com grandes dimensões, com aumento da intensidade da coloração, com forma normal e rodeado por um citoplasma escasso. No entanto, ao contrário do padrão de malignidade estas alterações da intensidade da coloração ocorrem, de forma similar, em todas as células. Estas características são também típicas de células mais imaturas, localizadas em camadas mais basais, embora nos casos de inflamação crónica possam ser detectadas em camadas mais superficiais (Fig.5).

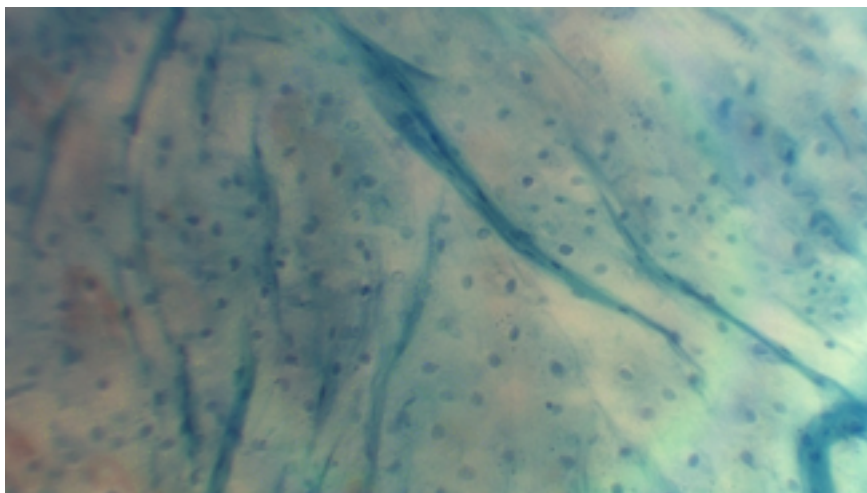


Fig. 5 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão de benignidade com homogeneidade celular mas com aumento das dimensões nucleares e com aumento da intensidade de coloração sugestivo de ligeira inflamação crónica.

Este aumento da coloração é normalmente regular. No entanto, pode ser difícil distinguir uma regularidade absoluta de uma pequena irregularidade (Fig.6).

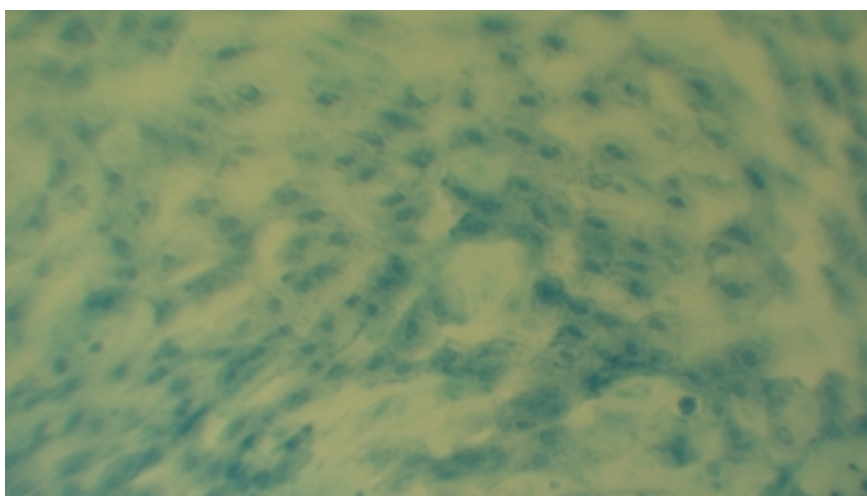


Fig. 6- Endoscopia de contacto 60X. Homogeneidade celular *borderline*, observando-se um aumento das dimensões nucleares com citoplasma escasso e aumento da intensidade de coloração sugestivo de inflamação crónica moderada. A forma das células possui ligeiras alterações podendo sugerir malignidade. Seria uma área a biopsar, correspondendo provavelmente a displasia.

## RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA

No padrão de malignidade os núcleos possuem dimensões aumentadas, o que aumenta a relação núcleo-citoplasma relativamente ao padrão normal. No entanto, a suspeita de malignidade baseia-se no aumento variável das dimensões do núcleo, observando-se uma variabilidade significativa no mesmo tecido (Fig. 7, 9). O padrão de inflamação crónica também tem aumento das dimensões dos núcleos e consequentemente da relação núcleo-citoplasma mas esse aumento é semelhante para todas as células (Fig. 5, 6, 8).

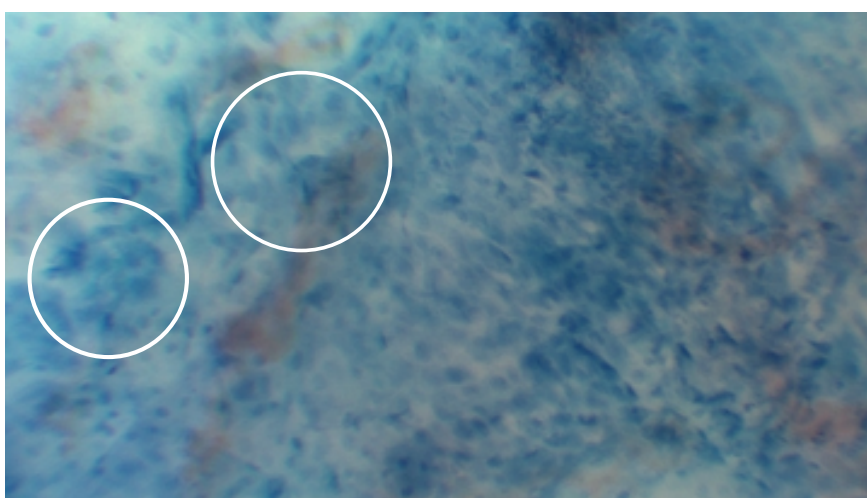


Fig. 7- Endoscopia de contacto 60X. Padrão de heterogeneidade. Observando-se células com relação núcleo-citoplasma aumentado e muito variável (círculos).

Os valores da sensibilidade, da especificidade e da exactidão foram elevados bem como o valor preditivo do positivo e negativo e a razão de verosimilhança, sendo estes valores sobreponíveis aos obtidos para a detecção de heterogeneidade e para a alteração da forma dos núcleos. Uma sensibilidade de 0,967 (IC 95% 0,833-0,994) e uma especificidade de 0,975 (IC 95% 0,928-0,991) para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto, o factor preditivo do positivo de 0,906 (IC 95% 0,758-0,968) e factor preditivo do negativo de 0,991 (IC 95% : 0,953-0,998) e uma exactidão de 0,973 (IC 95%: 0,933-0,989), associado a uma razão de verosimilhança de 38,02 e uma análise de concordância entre a existência de uma relação núcleo/citoplasma alterada e muito variável e o diagnóstico de malignidade obteve um índice Kappa 0,922  $p < 0,001$ , que é considerado muito elevado, representando uma concordância quase absoluta segundo a tabela de Landis JR e Koch GG .

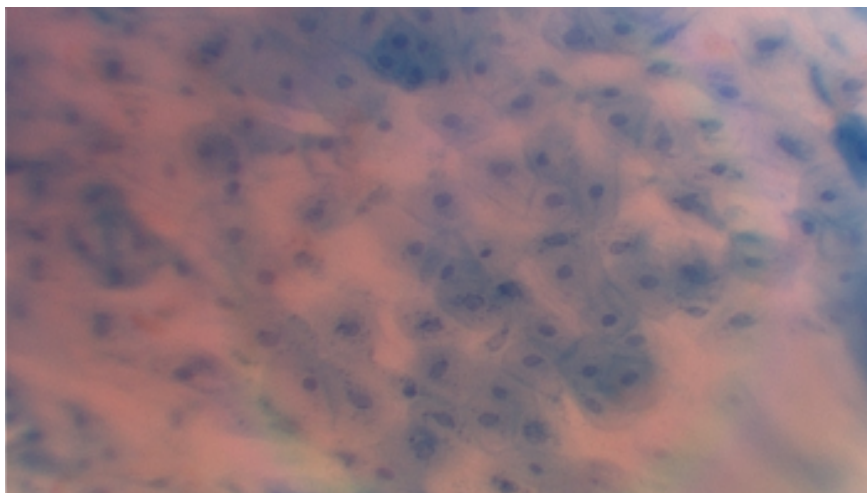


Fig. 8- Endoscopia de contacto 60X. Mucosa oral com inflamação crónica. Padrão de homogeneidade, observam-se células com relação núcleo-citoplasma aumentado mas semelhante entre as várias células do mesmo tecido.

## OBSERVAÇÃO DE NUCLÉOLOS

Muitos destes núcleos apresentam nucléolos muito proeminentes (Fig. 9) e, muitas vezes, observa-se mais que um nucléolo. No entanto, a observação de nucléolos não é patognomónica de malignidade. Enquanto que no contexto de homogeneidade esta observação não tem relevância, num contexto de heterogeneidade, é um reforço no sentido do diagnóstico de malignidade.

A sensibilidade em relação ao diagnóstico de malignidade foi muito elevada com um óptimo intervalo de confiança 0,967 (IC 95% 0,0833-0,994) e uma especificidade mais baixa e com um intervalo de confiança bastante alargado e relativamente baixo 0,737 (IC 95% 0,651-0,808). A exactidão apresenta também um valor relativamente baixo de 0,784 (IC 95% 0,711-0,842).

O valor preditivo do positivo foi de 0,483 (IC 95% 0,362-0,607), o mais baixo entre todos os achados celulares, e o valor preditivo do negativo foi de 0,989 (IC 95% 0,938-0,998).

A razão de verosimilhança foi também a mais baixa de todos os achados celulares com um valor de 3,68.

A concordância entre a detecção de nucléolos e o diagnóstico de malignidade foi avaliada com o índice Kappa com o valor mais baixo dos achados celulares de 0,493  $p < 0,001$ , o que representa, segundo a tabela de Landis JR e Koch GG, uma concordância moderada.

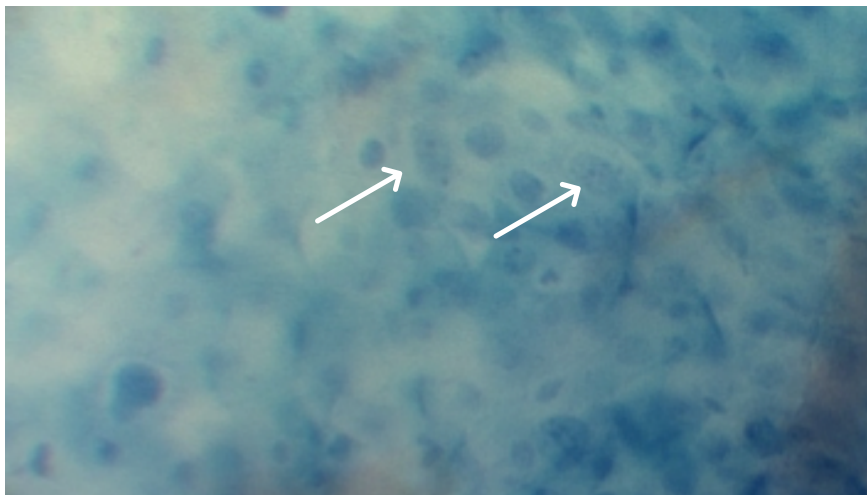


Fig. 9 - Endoscopia de contacto 60X. com zoom. Padrão de malignidade. Observam-se células com nucléolos visíveis.

## OBSERVAÇÃO DE MITOSES

A observação de células em mitose é outro achado celular característico do padrão celular de malignidade (Fig. 10). No entanto, este achado celular também é possível de observar em outras patologias não neoplásicas e mesmo em situações de normalidade. A sensibilidade para o diagnóstico de malignidade foi de 0,967 (IC 95% 0,833-0,994) o valor da especificidade foi de 0,797 (IC 95% 0,715-0,859), com uma exactidão de 0,831 (IC 95% 0,762-0,883). O valor preditivo do positivo foi o mais baixo com 0,577 (IC 95% 0,414-0,673) o valor preditivo do negativo é bastante elevado e com um intervalo de confiança bastante estreito de 0,989 (IC 95% 0,943-0,998). A razão de verosimilhança do positivo foi de 4,75. O valor de concordância do índice Kappa 0,587 revelou uma concordância moderada entre a observação de mitoses e o diagnóstico de malignidade segundo a tabela de Landis JR e Koch GG.



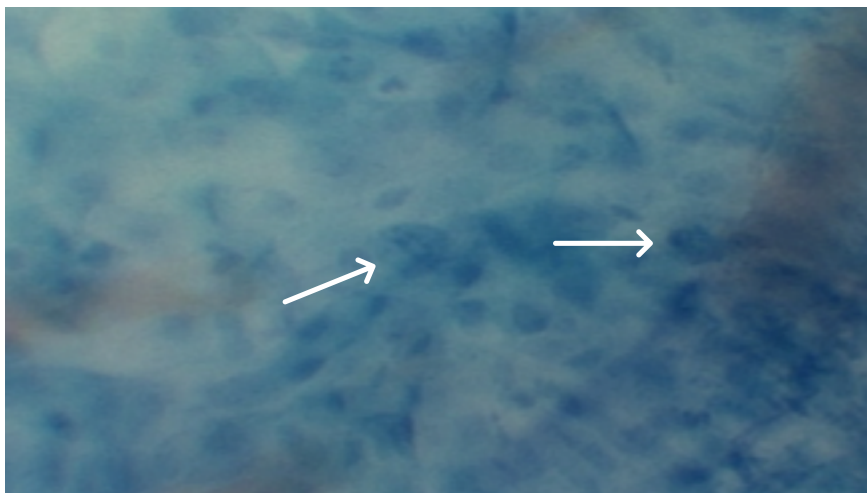


Fig.10 - Endoscopia de contacto 60X. com zoom. Padrão de malignidade. Observam-se células com aspecto compatível com figuras de mitose (seta).

Todas estas características podem ser observadas com 60 aumentos de ampliação, com ou sem zoom. Em algumas situações específicas que necessitam de grande ampliação realizamos o seu estudo com 150 aumentos. A observação de nucléolos ou mitoses são os achados celulares que requerem uma maior ampliação e resolução para a sua detecção.

## HIPERQUERATOSE

Os factores celulares que referimos podem ser estudados quando observamos os núcleos das células. Se a resposta à pergunta - é possível observar núcleos? - for negativa, significa que conseguimos apenas observar as células sem núcleos no seu interior. Consideramos então duas hipóteses (fluxograma 1):

Primeira hipótese: estamos a observar uma região de mucosa mastigatória. Neste caso, o tecido celular que observamos corresponde ao padrão de normalidade. O epitélio é constituído por células poliédricas cheias de citoqueratina que se transformam em escamas de queratina sem núcleo fazendo lembrar um mosaico de um pavimento (Fig. 11). As células possuem forma e dimensão semelhante entre si e encontram-se com uma disposição regular e muito organizada. O aspecto geral do tecido é de homogeneidade (Fig. 11).

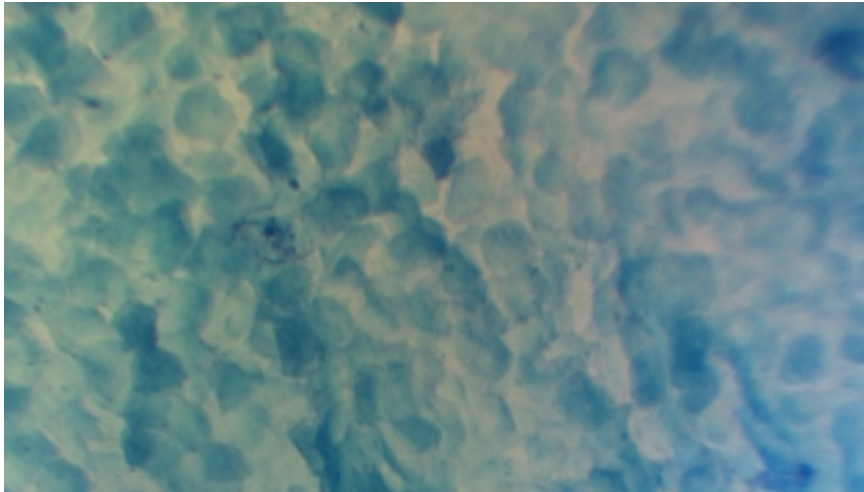


Fig. 11 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão homogéneo constituído por células sem núcleo visível e com distribuição regular.

Segunda hipótese (fluxograma 1): não estamos a observar uma área de mucosa mastigatória. Então, podemos dizer que o aspecto não é normal tratando-se de um diagnóstico de hiperqueratose. Esta área deverá ser biopsada para obter a confirmação anatomopatológica, ainda que o diagnóstico de endoscopia de contacto possa variar conforme a hiperqueratose seja homogénea ou heterogénea. Se for homogénea é sugestiva de benignidade (Fig. 12), se for de hiperqueratose heterogénea existe grande suspeita de malignidade (Fig. 13, 14).

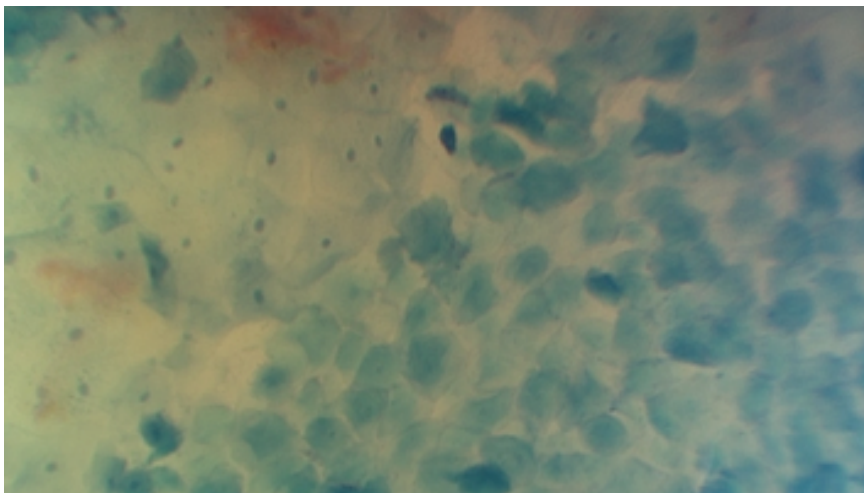


Fig. 12 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão homogéneo de hiperqueratose no limite de lesão. Observam-se as margens da lesão com células não queratóticas (seta). Área pouco suspeita de malignidade.

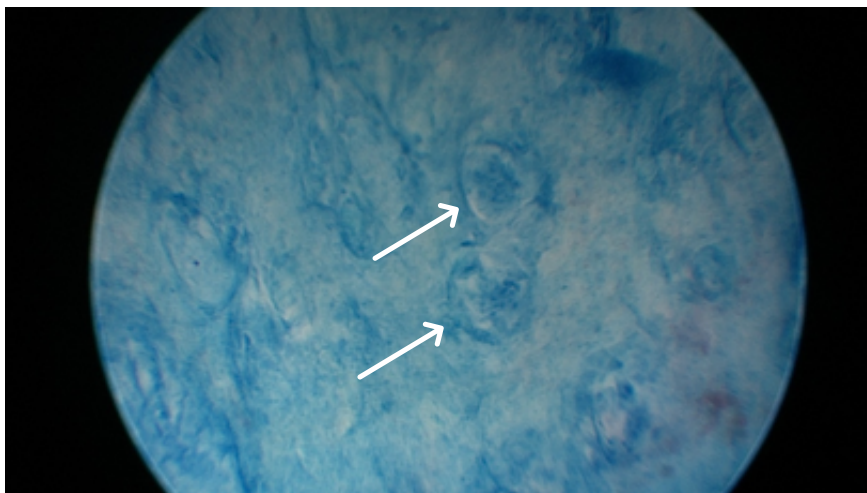


Fig. 13- Endoscopia de contacto 60X. Padrão heterogéneo de hiperqueratose, suspeito de malignidade. Observam-se *clusters* de células não queratóticas com morfologia sugestiva de malignidade (seta).

Em muitos casos observa-se apenas uma massa hiperqueratótica sem limites celulares (Fig. 13, 14). Em outros casos conseguimos definir os limites celulares, ainda que observemos uma grande variação na acumulação de queratina (Fig. 15). Podem ainda identificar-se ilhotas ou pequenos agrupamentos de células atípicas, associados a um padrão de hiperqueratose heterogénea, sendo este padrão muito sugestivo de malignidade (Fig. 14, 15).

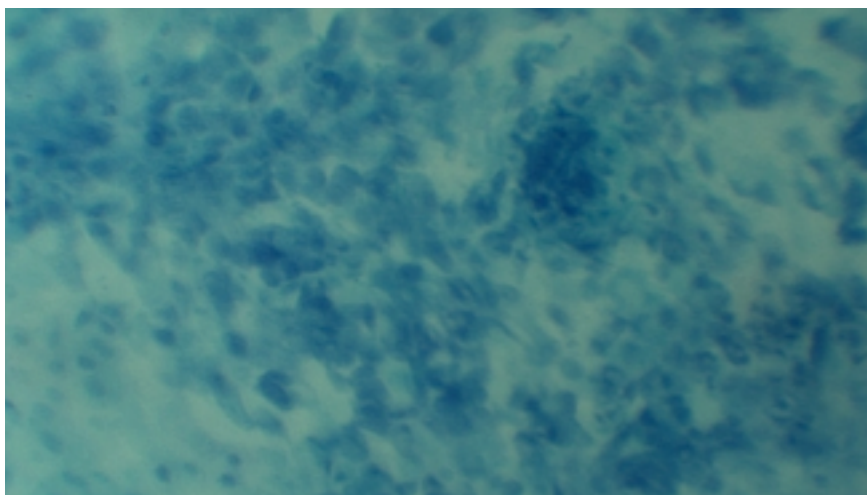


Fig. 14 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão heterogéneo de hiperqueratose. Observam-se *clusters* de células atípicas (seta). Suspeita de malignidade.

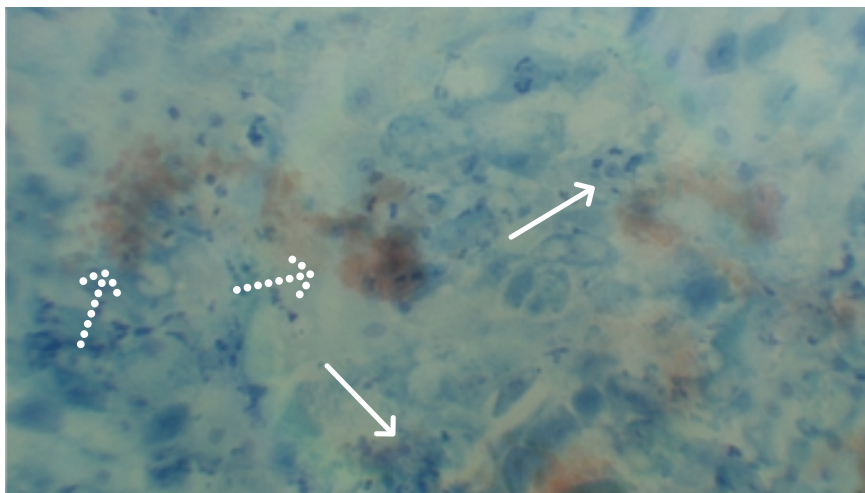


Fig. 15 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão heterogéneo de hiperqueratose. Observando-se algumas células dispersas e em pequenos grupos com características sugestivas de malignidade (seta) e microvascularização com padrão suspeito de malignidade (seta descontinua).

O facto da hiperqueratose condicionar em alguns casos o acesso à observação das alterações ou achados celulares atrás descritos, pode obrigar-nos a basear o diagnóstico no tipo de hiperqueratose e nos achados vasculares.

A microvascularização pode ser visível na área central da lesão hiperqueratótica (Fig. 15), ainda que seja mais fácil de observar nas margens da lesão. Os fenómenos de neoangiogénese são frequentemente detectáveis nos territórios marginais à lesão hiperqueratótica tumoral.

A sensibilidade e especificidade da observação por endoscopia de contacto, de hiperqueratose heterogénea e irregular quando comparada com o diagnóstico de malignidade da anatomia patológica é respectivamente de 1 (IC 95% 0,839-1) e 0,931 (IC 95% 0,848-0,970). Estes valores, embora tenham intervalos de confiança não muito estreitos, são significativos. Em todas as situações de malignidade com hiperqueratose, o tipo observado foi o heterogéneo e irregular ainda que em alguns casos de benignidade também se possa descrever hiperqueratose com algum grau de irregularidade, principalmente em situações de grande hiperqueratose. Nestes casos, é a avaliação da microcirculação que orienta o diagnóstico para a benignidade ou malignidade. O valor preditivo do positivo foi um pouco mais baixo e apresentou um intervalo de confiança um pouco alargado 0,800 (IC 95% 0,609-0,911). O valor preditivo do negativo é máximo e tem um intervalo de confiança estreito 1 (IC 95% 0,946-1). A

exactidão é de 0,946 com um intervalo de confiança relativamente estreito (IC 95% 0,879-0,977). A razão de verosimilhança - 14,4 - é boa e o índice Kappa 0.912 revela uma concordância quase absoluta.

## PADRÃO VASCULAR

A observação da microcirculação deve ser sempre realizada, sendo invariavelmente muito útil, podendo ser determinante e imprescindível quando não é possível observar as células. Algumas lesões têm um padrão vascular típico. Entre estas destacamos as papilomatoses e as lesões únicas de etiologia HPV (Human Papiloma Vírus) que apresentam um padrão característico de ansas vasculares de arquitetura regular (Fig. 16). Os koilocitos são células com vacúolos citoplasmáticos, que por vezes têm um núcleo em crescente ou semilua, e que são frequentes nas células infectadas pelo vírus do papiloma humano, ainda que na mucosa da boca sejam pouco específicas.

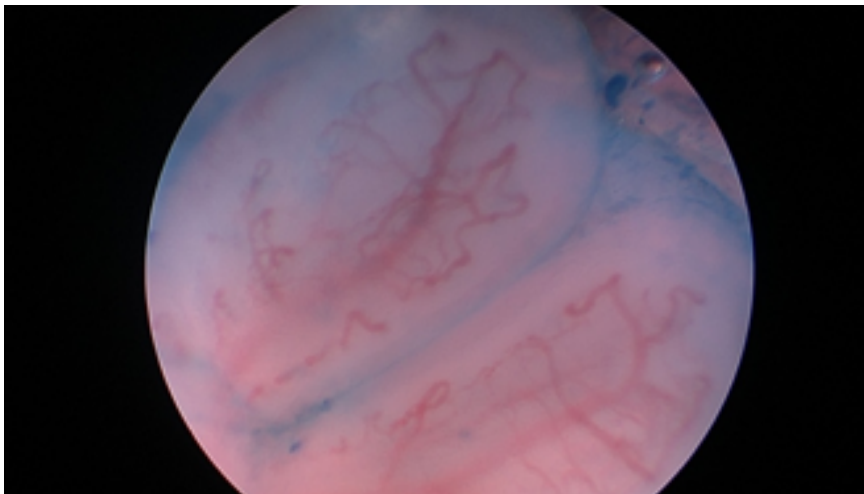


Fig. 16 - Endoscopia de contacto 60X. Observam-se duas papilas de lesão por HPV da mucosa oral com eixo vascular típico.

Os tumores malignos possuem um padrão típico composto por uma arquitectura vascular anárquica, podendo assumir algumas formas típicas, como as de vasos em cauda de porco ou em saca-rolhas irregulares, ou até mesmo de novelos de vasos de disposição irregular. No entanto, o mais específico e mais frequente é a existência de um dismorfismo vascular inespecífico. Os carcinomas, mesmo em estádios iniciais, apresentam alterações vasculares, embora em casos de invasão da lâmina própria a neovascularização seja mais expressiva, com mais vasos, com maior alteração da forma



e com maior friabilidade das suas paredes. Nesse sentido, os achados vasculares podem contribuir para o diagnóstico de malignidade, indiciando também rotura da membrana basal e invasão da lâmina própria.

Normalmente é possível observar a microcirculação da mucosa, embora a qualidade da imagem da microcirculação seja muito variável dependendo das características dos próprios vasos e da estrutura morfológica do epitélio sobrejacente, nomeadamente, da espessura e da eventual existência de queratose superficial.

Os achados ou alterações vasculares, por nós considerados como os mais expressivos para a definição do padrão vascular de malignidade, foram definidos como factores vasculares ou achados vasculares.

#### FACTORES OU ACHADOS VASCULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO:

- Heterogeneidade/homogeneidade da arquitectura vascular
- Ectasias ou deformações das paredes vasculares
- Observação de microtromboses
- Observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos.

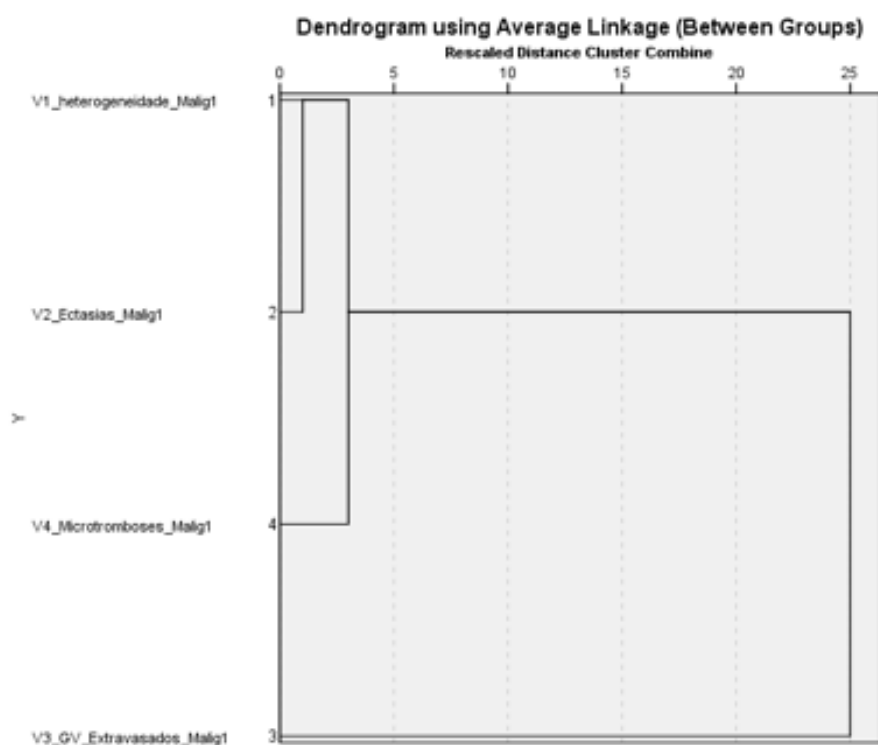
Tal como tínhamos procedido em relação aos factores celulares, avaliámos a consistência interna dos achados vasculares na globalidade e a sua validade diagnóstica em grupo. O resultado foi um índice alfa de Cronbach de 0,926 que se considera também muito elevado, embora ligeiramente inferior ao obtido para os factores celulares. Para avaliar se a eficiência da acção diagnóstica do grupo melhoraria com a remoção de qualquer dos factores vasculares do grupo diagnóstico, testámos o alfa de *Cronbach if item deleted* que revelou não existir vantagem em remover algum dos factores uma vez que o índice de diagnóstico não melhorava. A detecção de glóbulos vermelhos extravasados melhora o índice ao ser retirado, mas apenas em 0,003, o que não tem significado (Tab. 6). Estando garantido que estes factores vasculares em grupo são eficazes, possuindo uma boa capacidade para realizar o diagnóstico de malignidade (índice alfa de Cronbach), testámos a classificação dos achados vasculares entre si e verificámos que são significativamente diferentes (Cochran's Q <0,001). Feitas as comparações múltiplas com correcção de Bonferroni conclui-se que o achado vascular mais distinto e mais responsável por se rejeitar a igualdade foi a observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos.



	Cronbach's Alpha if Item Deleted
Heterogeneidade vascular	0,900
Dismorfismo vascular	0,900
Glóbulos vermelhos extravasados	0,929
Microtromboses	0,880

**Tabela 6**

Para avaliar a importância relativa destes factores celulares e a sua inter-relação realizámos uma análise de *clusters* que nos mostrou a existência de 2 *clusters* distintos (Tab. 7).



**Tabela 7**

O primeiro *cluster* é formado por 3 factores vasculares: heterogeneidade da arquitectura vascular, a existência de ectasias e de outras alterações da forma dos vasos e a existência de microtromboses.

O segundo *cluster* é formado apenas por 1 factor vascular: a existência de glóbulos vermelhos fora dos vasos.

Tal como já tinha sucedido para os achados ou factores celulares, os resultados anteriores e a experiência clínica suportam o parecer de existir vantagem na avaliação de todos os factores vasculares. Estes devem ser observados e avaliados em sequência como o definido na árvore de decisão (fluxograma 2) e os valores da capacidade discriminativa para o diagnóstico de malignidade (sensibilidade, especificidade, razão de verosimilhança do positivo e do negativo), da capacidade preditiva para o diagnóstico de malignidade (valor preditivo do positivo e do negativo e exactidão) e do índice de concordância Kappa comparando a capacidade de detecção de cada um destes factores vasculares e do diagnóstico de malignidade por exame anatomopatológico, permitiram definir, também neste grupo de diagnóstico, os factores major e os factores minor.

#### FACTORES MAJOR

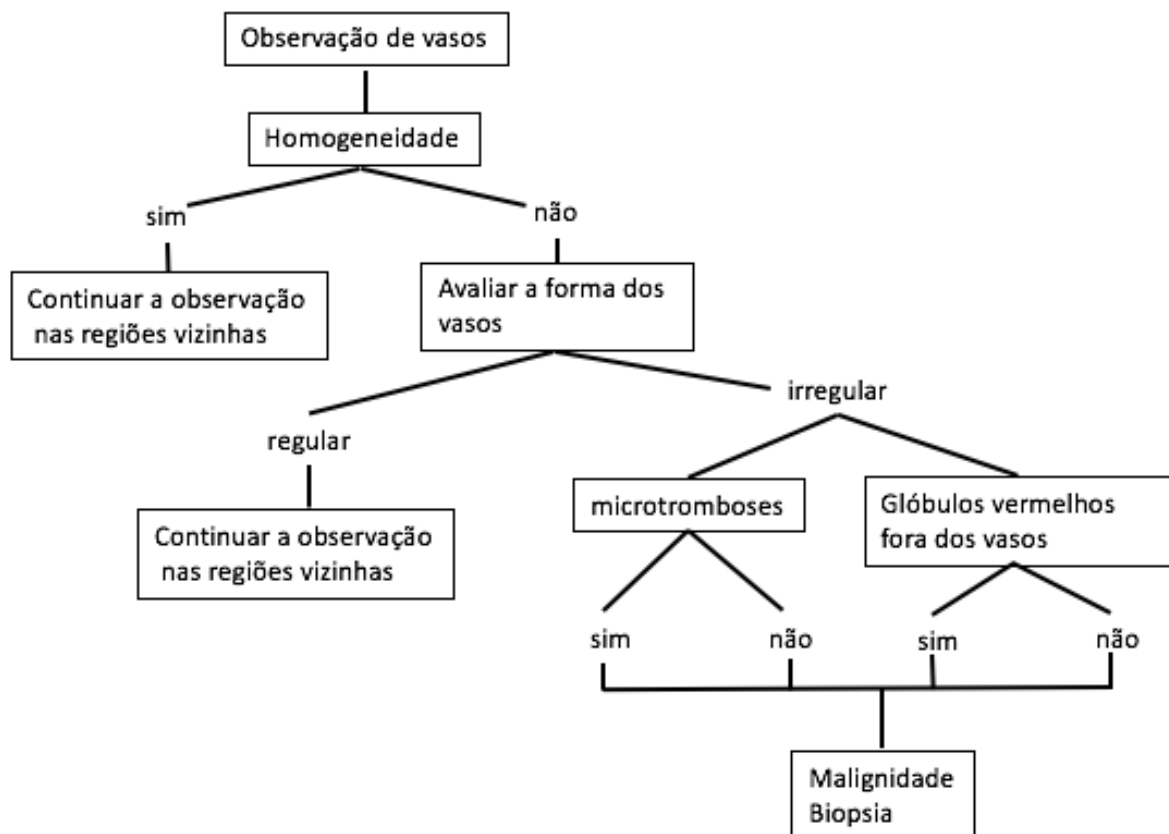
- Heterogeneidade da arquitectura vascular
- Alteração da forma dos vasos
- Observação de microtromboses

#### FACTORES MINOR

- Observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos.

## HOMOGENEIDADE/HETEROGENEIDADE VASCULAR

O primeiro factor a avaliar é, tal como no padrão celular, a existência de homogeneidade ou harmonia estrutural da microcirculação ou, em oposição, a heterogeneidade, representada por uma microcirculação com arquitectura desordenada e caótica (Fluxograma 2).



Fluxograma 2 - Árvore de decisão para diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto e para determinação de que área da mucosa biopsar com base no padrão vascular.

Se observamos um padrão de homogeneidade com vasos de tamanho e forma semelhante com uma distribuição organizada e típica do território em estudo (Fig. 17), estamos perante uma área sem lesão maligna e podemos continuar a observação para outras áreas vizinhas (Fluxograma 2).

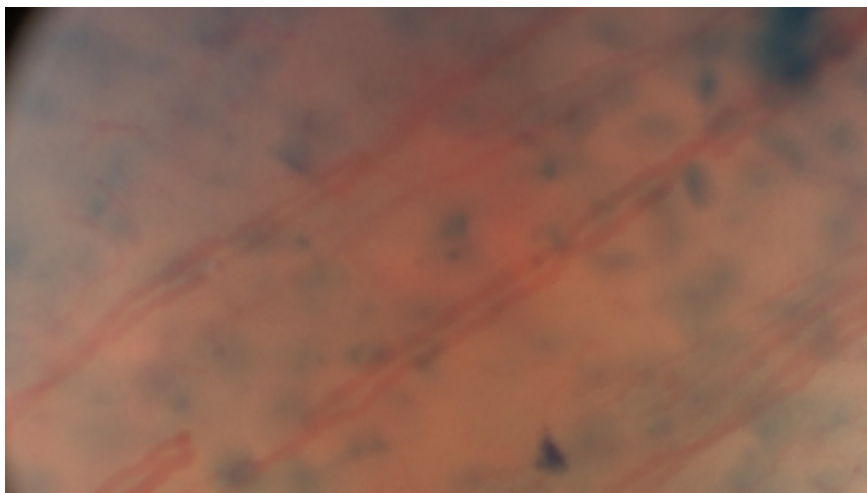


Fig. 17 - Endoscopia de contacto 60X. Padrão vascular de benignidade. Vasos com forma e distribuição regular.

Se observarmos heterogeneidade e uma arquitectura caótica suspeita-se de malignidade. Devemos então, aumentar a ampliação e avaliar de forma individual a forma dos vasos (Fig. 18) .

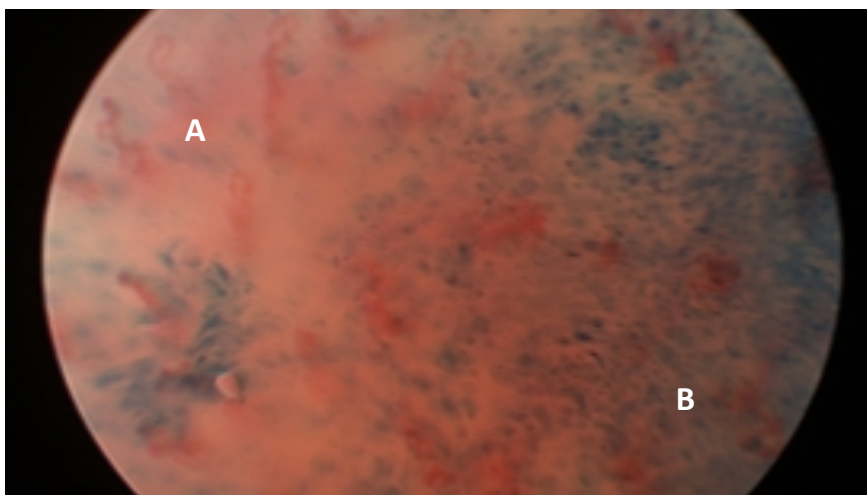


Fig. 18 - Endoscopia de contacto 60X. Área marginal a lesão maligna (B). Observam-se à esquerda da imagem (A) vasos em ansa com forma e distribuição regular e à direita (B) vasos com forma mal definida de maior diâmetro e com menor ordenação na sua distribuição.

A sensibilidade e especificidade revelaram uma boa capacidade discriminativa para a observação de heterogeneidade, por endoscopia de contacto, quando comparado com o diagnóstico de malignidade com valores elevados reforçados com intervalos de confiança curtos, principalmente na especificidade. O valor da sensibilidade foi de 0,967

(IC 95% 0,833-0,994) e o da especificidade de 0,975 (IC 95% 0,928-0,991) com valor preditivo do positivo de 0,906 (IC 95% 0,758-0,968) e preditivo do negativo de 0,991 (IC 95% 0,953-0,998). Este último com um intervalo de confiança curto e entre valores elevados. O acerto de exactidão foi de 0,973 (IC 95% 0,933-0,989), um valor muito bom, e a razão de verosimilhança foi também muito elevada com um resultado de 38,02. O índice de concordância Kappa foi de 0,941  $p < 0,001$  tendo revelado concordância quase absoluta pelas tabelas de Landis JR e Koch GG (Tab. 8).

	Sensibilidade	Especificidade	Razão de verosimilhança do positivo	Índice Kappa	Valor preditivo do positivo	Valor preditivo do negativo	Exactidão
Padrão vascular heterogéneo (V1)	0,967 (0,83-0,99)	0,975 (0,92-0,99)	38,2	0,941 $P < 0,001$	0,906 (0,75-0,96)	0,991 (0,95-0,99)	0,973 (0,93-0,98)
Dismorfismo vascular (V2)	0,833 (0,66-0,92)	0,941 (0,88-0,97)	14,05	0,848 $P < 0,001$	0,781 (0,61-0,89)	0,957 (0,90-0,98)	0,919 (0,86-0,95)
Glóbulos vermelhos fora dos vasos (V3)	0,600 (0,42-0,75)	1 (0,96-1)	Tende para infinito	0,656 $P < 0,001$	1 (0,82-1)	0,900 (0,84-0,94)	0,919 (0,86-0,95)
Microtromboses (V4)	0,733 (0,55-0,85)	0,983 (0,94-0,99)	43,26	0,809 $P < 0,001$	0,917 (0,74-0,97)	0,934 (0,88-0,96)	0,932 (0,88-0,96)

**Tabela 8**

Algumas formas típicas dos vasos como a de saca-rolhas e de novelos irregulares contribuem também para a heterogeneidade (Fig. 19,20). Qualquer forma complexa que não se repita com uma forma sobreponível e com regularidade, deve ser considerada suspeita de malignidade. No padrão de malignidade observamos vasos com formas complexas únicas, completamente distintas entre si e com uma distribuição não ordenada, caótica.

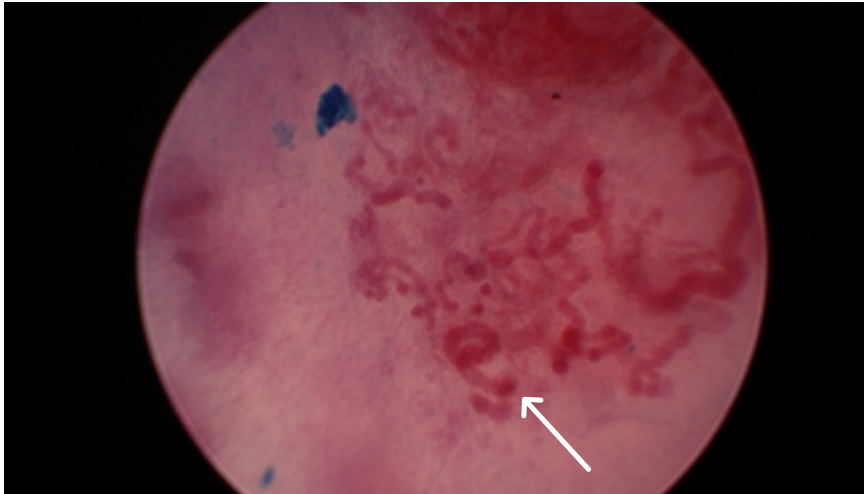


Fig. 19 - Endoscopia de contacto 60X. Vasos em forma de novelo irregular, constituído por segmentos de diâmetro irregular. Registam-se aspectos sugestivos de microtromboses, áreas de irregularidade da circulação visíveis na foto como áreas “nodulares” (seta). Padrão sugestivo de malignidade.

## DISMORFISMO VASCULAR

Outro achado vascular a observar corresponde às ectasias vasculares ou deformações das paredes vasculares (Fig. 20). A forma dos vasos deve ser harmoniosa e semelhante à forma normalmente observada nessa região (Fig. 21). As paredes dos vasos normais são mais ou menos lineares independentemente da forma que possuam (Fig. 21). Os vasos associados às lesões neoplásicas são neo-vasos com diâmetros irregulares e grandes deformações (Fig. 20,22).



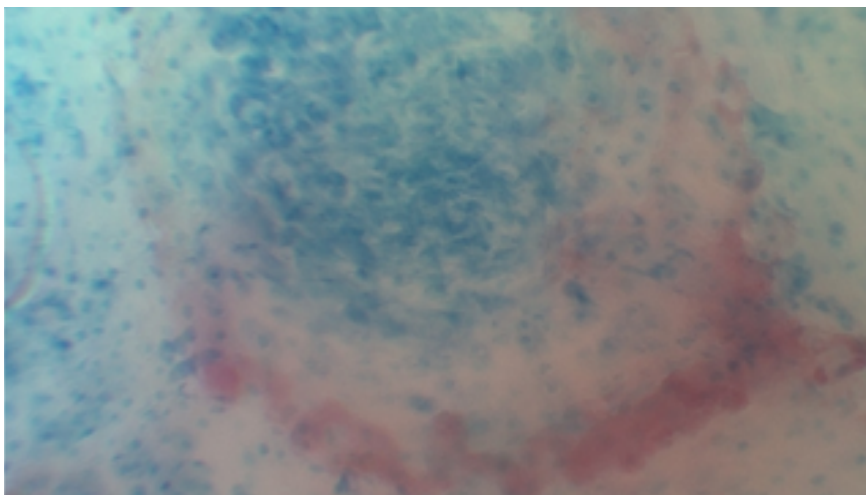


Fig. 20 - Endoscopia de contacto. Padrão de malignidade. Paredes irregulares com ectasias, vasos com forma em saca-rolhas irregular.

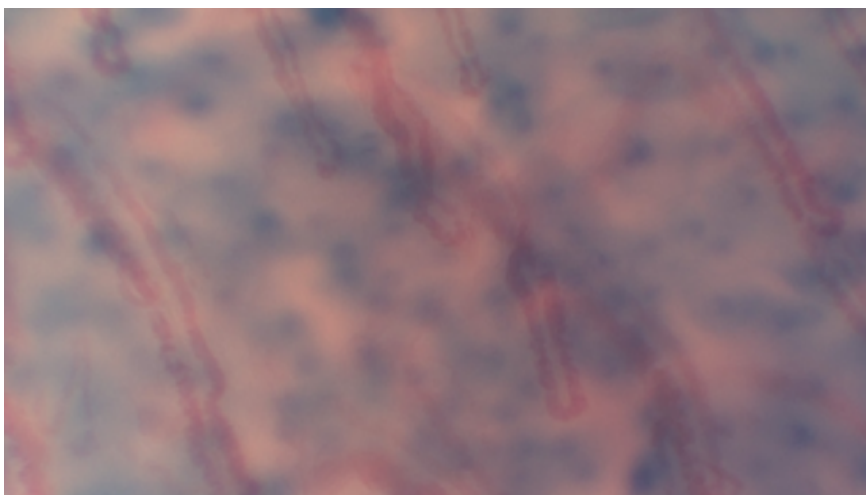


Fig. 21 - Endoscopia de contacto 150X vasos com padrão de normalidade com paredes sem irregularidades e apresentando forma e distribuição harmoniosa.

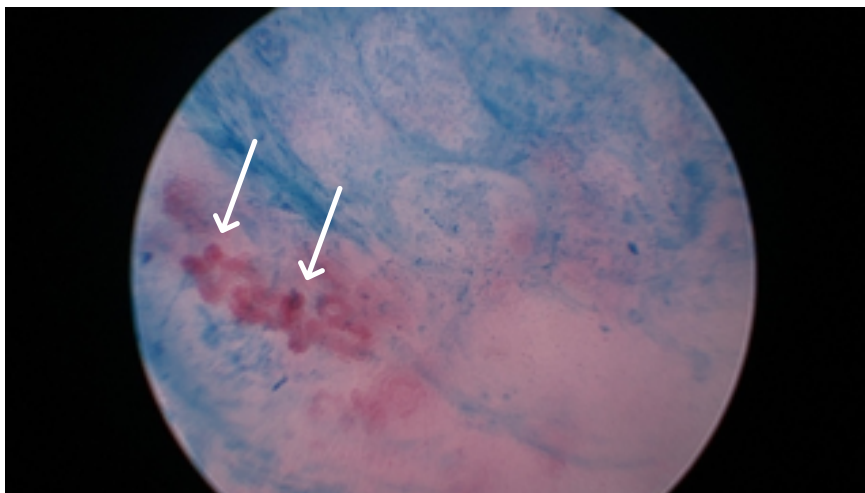


Fig. 22 - Endoscopia de contacto- vasos com padrão de malignidade. Observa-se ansa vascular com forma irregular e com aspectos sugestivos de microtromboses (setas).

O resultado da sensibilidade 0,833 (IC 95% 0,664-0,927) é relativamente elevado embora com um intervalo de confiança um pouco alargado. A especificidade 0,941 (IC 95% 0,883-0,971) possui um melhor resultado apoiado por um intervalo de confiança mais estreito. O valor preditivo do positivo é de 0,781 (IC 95% 0,612-0,890) e o preditivo do negativo de 0,957 (IC 95% 0,903-0,981). A exactidão tem um bom resultado com 0,919 (IC 95% 0,864-0,953), apoiado por um intervalo de confiança razoável. A razão de verosimilhança do positivo foi de 14,05. O índice Kappa de concordância foi de 0,848  $p < 0,001$ , que é considerada uma concordância quase absoluta, segundo a tabela de Landis JR e Koch GG.

## MICROTROMBOSES

As microtromboses são reconhecíveis como aglomerados de células vermelhas, em estase, que não circulam (Fig. 22, 23, 24), devem considerar-se sempre que a circulação não seja regular e harmoniosa. Este achado reforça o diagnóstico de malignidade, ainda que a sua ausência não o anule, mas diminua a capacidade de diagnóstico (Cronbach's alfa if item deleted de 0,880 para uma referência do diagnóstico em conjunto de 0,926). Consideramos ser um factor major como factor individual.

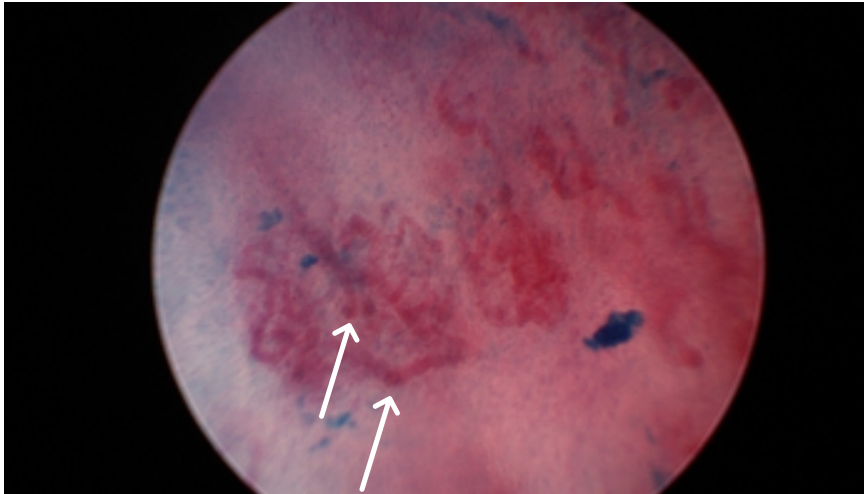


Fig. 23 - Endoscopia de contacto- 60X vasos com padrão de malignidade. Observam-se novelos de vasos com paredes irregulares e com espessamentos sugestivos de microtromboses (setas).

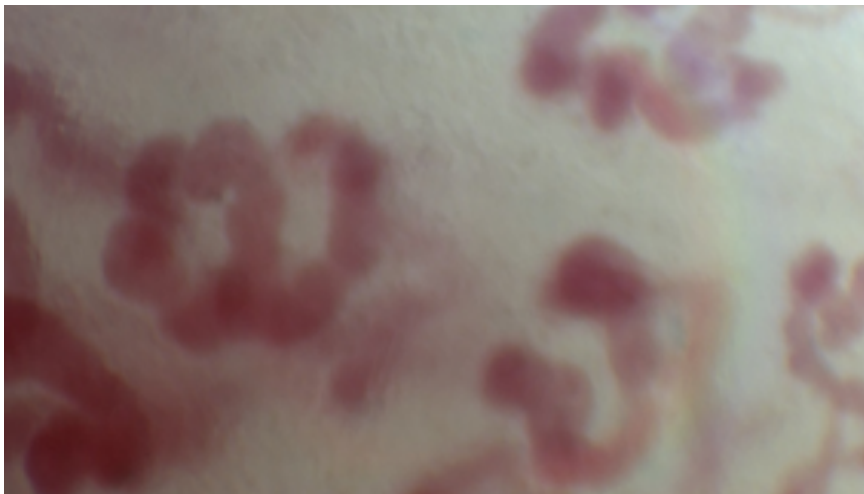


Fig. 24 - Endoscopia de contacto 150X. Vasos com padrão de malignidade. Observam-se ansas de vasos com ectasias das paredes vasculares e áreas suspeitas de microtromboses, difíceis de distinguir numa imagem estática (seta).

A sensibilidade revelou valores relativamente baixos em relação aos outros factores major com 0,733 (IC 95% 0,556-0,858) e uma especificidade alta com um óptimo intervalo de confiança 0,983 (IC 95% 0,940-0,995), um valor preditivo do positivo de 0,917 (IC 95% 0,742-0,977) e um valor preditivo do negativo de 0,934 (IC 95% 0,880-0,965). Uma razão de verossimilhança do positivo de 43,26, um valor a revelar uma probabilidade muito alta de malignidade se detectadas microtromboses e exactidão de 0,932 (IC 95% 0,880-0,963) com um índice de concordância Kappa de 0,809  $p < 0,001$  que está na fronteira entre a concordância substancial e a concordância quase perfeita, segundo as tabelas de Landis JR e Koch GG.

## GLÓBULOS VERMELHOS FORA DOS VASOS

A observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos, sugerindo friabilidade das paredes vasculares, é igualmente típica de malignidade na observação por endoscopia de contacto. A friabilidade dos vasos traduz-se na observação de pequenos grupos de glóbulos vermelhos fora dos vasos (Fig. 25), e não de uma saída profusa como no caso de hemorragia por secção da parede vascular. Os vasos subepiteliais que demonstram esta fragilidade são de pequeno calibre.

Os valores obtidos são bastante baixos para a sensibilidade 0,600 (IC 95% 0,423-0,754) e em contraste, máximos para a especificidade 1 (IC 95% 0,968-1), com um valor preditivo do positivo máximo de 1 (IC 95% 0,824-1) e um valor preditivo do negativo bom de 0,908 (IC 95% 0,846-0,946). A exactidão foi de 0,919 (IC 95% 0,864-0,953) revelando um valor bastante bom. O índice de concordância Kappa foi de 0,656  $p < 0,001$ , sugerindo concordância substancial segundo as tabelas de Landis JR e Koch GG. Foi o valor mais baixo de todos os factores vasculares, reforçando a sua definição como factor minor de diagnóstico.

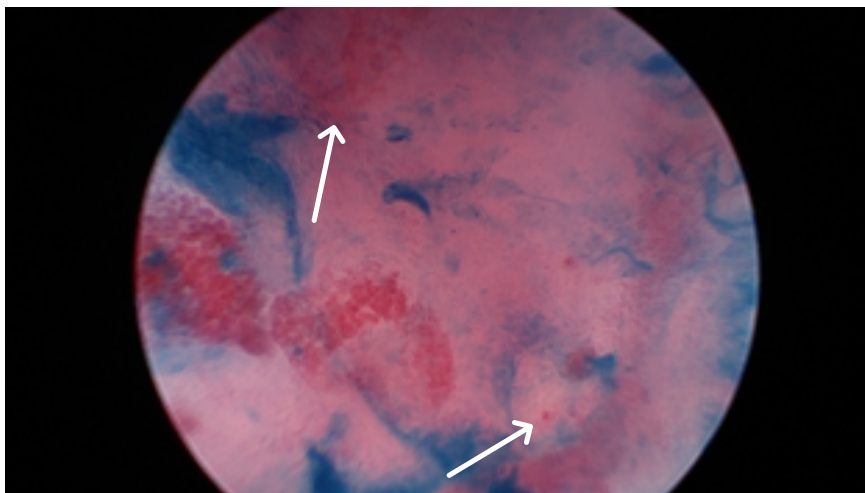


Fig. 25 - Endoscopia de contacto. Vasos friáveis, observando-se glóbulos vermelhos fora dos limites vasculares (seta). Observam-se grandes dilatações vasculares.

Os padrões celular e vascular devem ser sempre avaliados em conjunto e o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto deverá ser sempre estabelecido, com pelo menos um deles a revelar-se sugestivo de malignidade.

## CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

A nossa proposta para definir um protocolo de realização da endoscopia é uma árvore de decisão que permita orientar e sistematizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. Este modelo é suportado pelos resultados.

Todas as lesões devem ser avaliadas pelos dois ramos principais da árvore de procedimento e decisão que são a avaliação do padrão celular e do padrão vascular. Para aceitarmos o diagnóstico de malignidade bastará que um deles diagnostique malignidade (fluxograma 1,2).

No padrão celular o diagnóstico de malignidade é considerado quando 2 dos factores major e um factor minor são detectados, devendo um deles ser, obrigatoriamente, a heterogeneidade geral celular (anisocariose). No padrão celular considera-se uma excepção, quando não observamos núcleos poderemos aceitar um diagnóstico de malignidade apenas com base em 1 factor major de diagnóstico que será, obrigatoriamente, a presença de hiperqueratose heterogénea.

No padrão vascular, o diagnóstico de malignidade deverá estar dependente da confirmação de dois factores major, em que um deles deverá ser, obrigatoriamente, a heterogeneidade da arquitectura vascular. Não é necessário nenhum factor minor associado.

Sabendo que podemos fazer um diagnóstico válido de malignidade por endoscopia de contacto e conhecendo os procedimentos para a sua execução, estamos então aptos a fazer o rastreio da superfície da mucosa oral para detectar possíveis lesões malignas e realizar a sua correcta delimitação, fazer o seu mapeamento e determinar as áreas a biopsar.

## DISPLASIA

A endoscopia de contacto não tem por objectivo diagnosticar diferentes tipos de displasia, segundo os critérios clássicos que foram desenvolvidos, especificamente, para o exame anátomo-patológico. No entanto, é possível detectar a displasia grave ou carcinoma in situ. Os restantes tipos de displasia são passíveis de identificação por endoscopia de contacto, no entanto, o diagnóstico diferencial de áreas de displasia ligeira ou moderada é difícil de efectuar. A detecção de áreas de displasia é realizada com base em alterações qualitativas do padrão celular, em que são considerados apenas os achados celulares major, que deverão apresentar um grau de alteração ligeiro a moderado mas sem ultrapassar os limites do normal, entrando no domínio da malignidade (Fig.26). As células apresentam ligeiras alterações das dimensões e forma dos núcleos e um ligeiro aumento da relação núcleo-citoplasma. Estas alterações não atingem todas as células, envolvendo habitualmente pequenos grupos de células, não sendo suficientes para condicionar um padrão de heterogeneidade celular e, por isso, cumprir os critérios de malignidade. Estes doentes são considerados doentes de risco e devem, por isso, ter um seguimento com consultas mais frequentes (Fig.26).

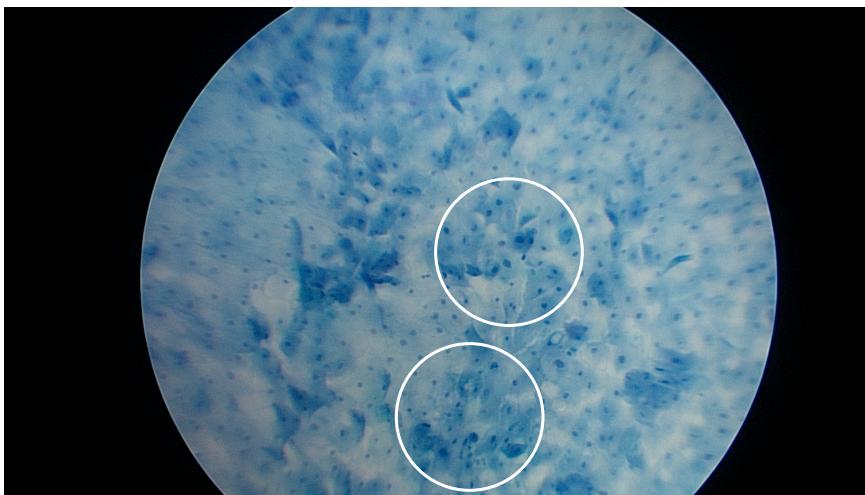


Fig. 26 - Endoscopia de contacto 60X. Displasia. Observam-se núcleos um pouco maiores apenas em algumas células (círculo). A forma das células está mantida e a relação núcleo-citoplasma esta aumentada mas não de uma forma anárquica embora não igual em todas as células como nos casos de inflamação crónica.

## CRITÉRIO SIMPLIFICADO PARA DIAGNOSTICAR MALIGNIDADE, MANTENDO A MESMA SEGURANÇA DIAGNÓSTICA

Uma árvore de decisão é uma estrutura gráfica de suporte à decisão e é um dos modelos mais práticos e mais usados em inferência indutiva. O resultado do teste de árvores de decisão ajuda a suportar a tese de podermos simplificar os critérios de diagnóstico, realizando o diagnóstico de malignidade logo nos primeiros níveis de observação e decisão, nomeadamente, no primeiro nó ou nível da árvore em que se realiza a identificação de heterogeneidade celular e vascular (Tab. 9, 10).



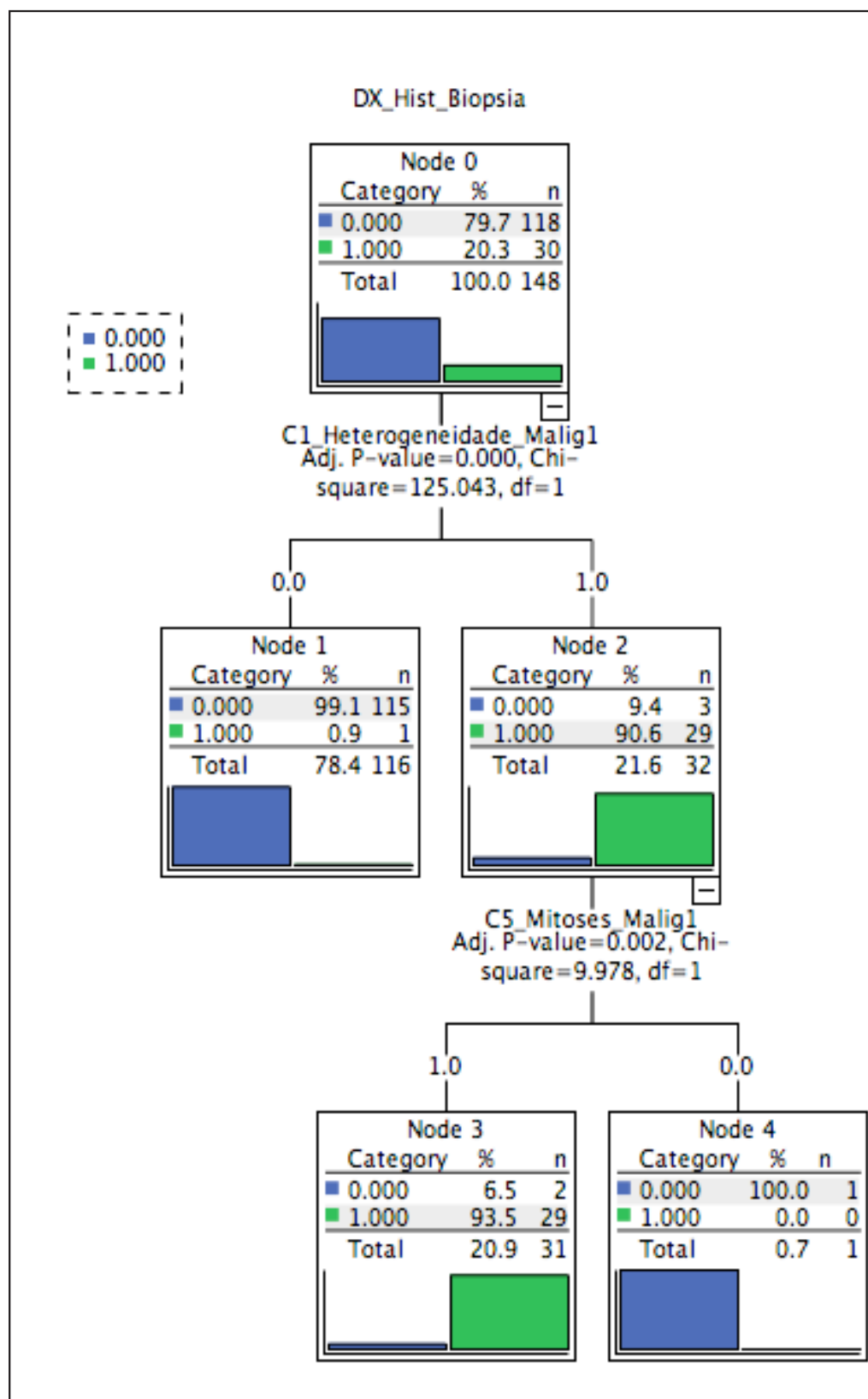


Tabela 9

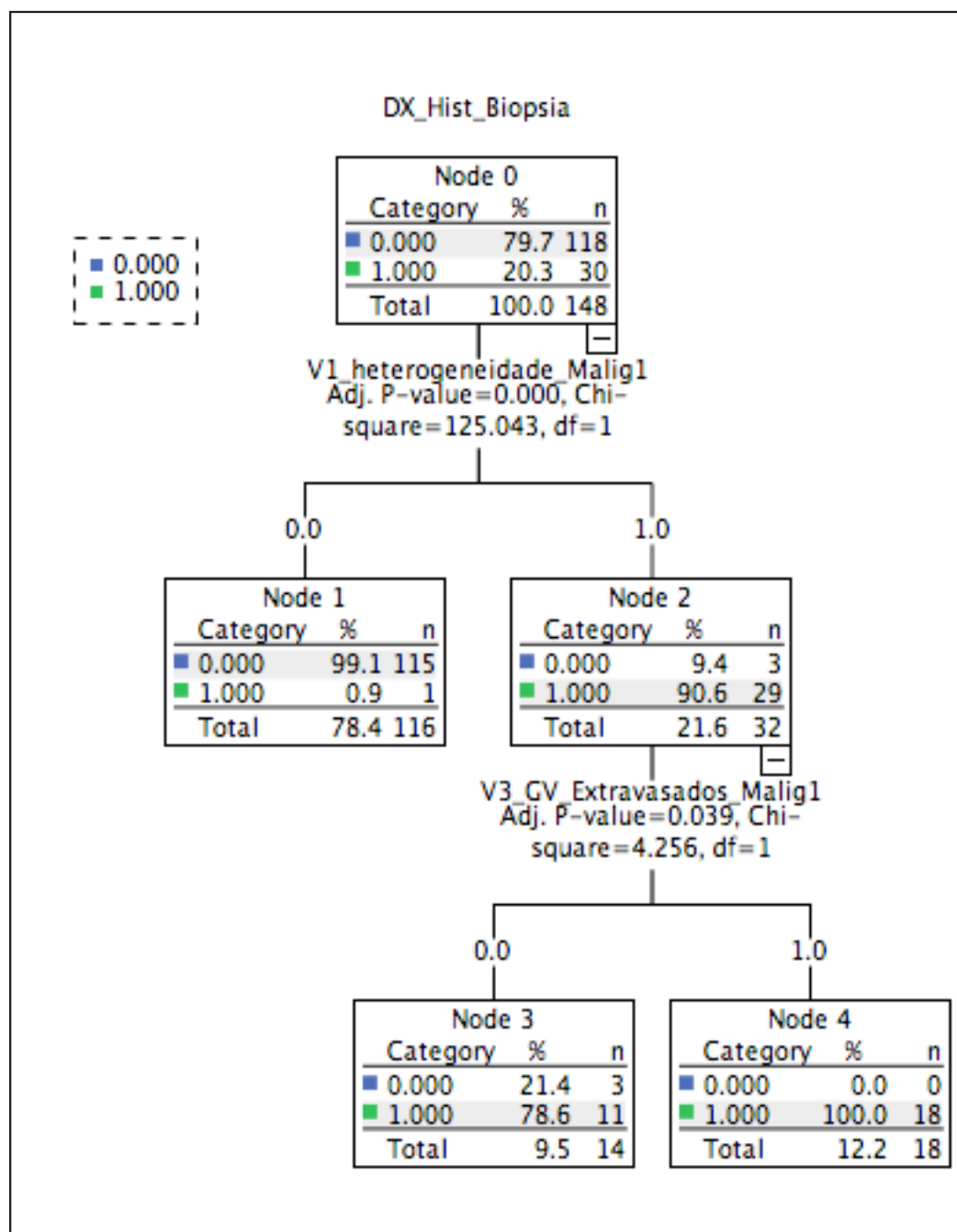


Tabela 10

## MARGENS MICROSCÓPICAS E MAPEAMENTO DAS LESÕES

O aparecimento das alterações agora descritas pode ser mais abrupto ou mais gradual, definindo uma margem microscópica mais estreita ou mais larga. É possível realizar rapidamente o mapeamento da mucosa, com base na definição dos contornos microscópicos da lesão (Fig. 27,28,29,30). A observação da região adjacente é igualmente importante para determinar possíveis focos de doença, fora da área macroscópica da lesão.

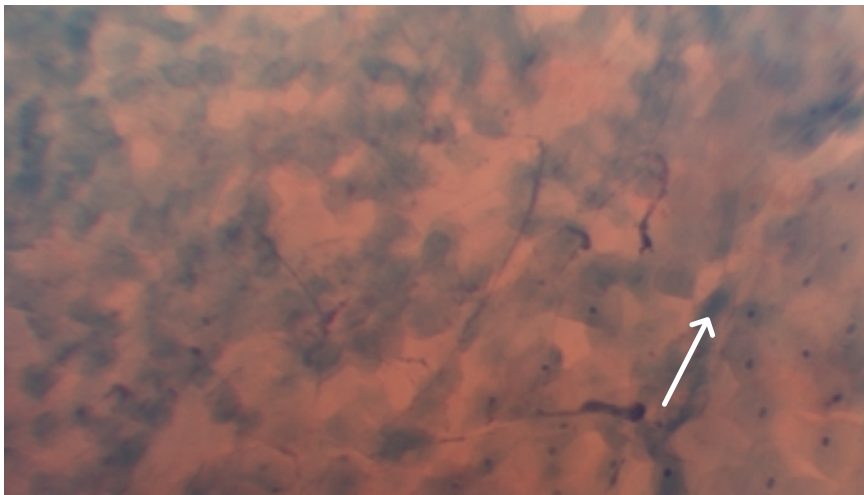


Fig. 27 - Endoscopia de contacto 60X. Margem de lesão hiperqueratótica (Seta). Células com hiperqueratose ligeira homogénea. As células da mucosa adjacente têm características morfológicas normais.

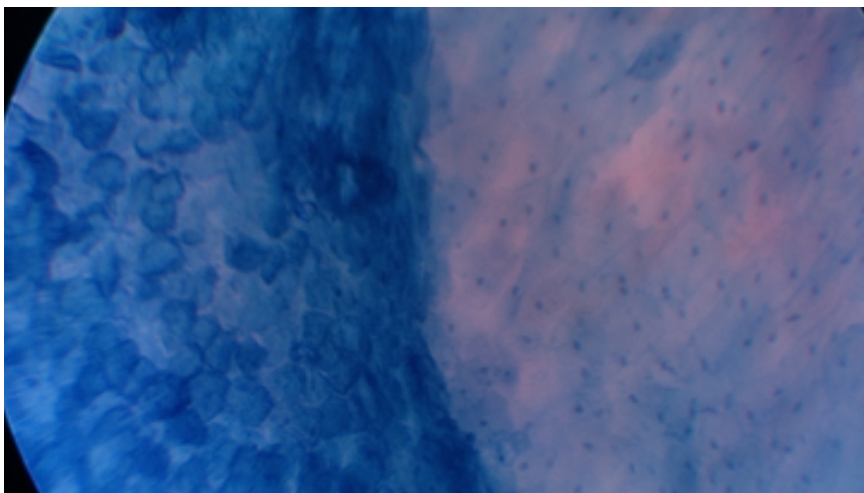


Fig. 28 - Endoscopia de contacto 60X. Margem de lesão hiperqueratótica. Células com hiperqueratose marcada e ligeiramente heterogénea. As células da mucosa adjacente têm características morfológicas normais.

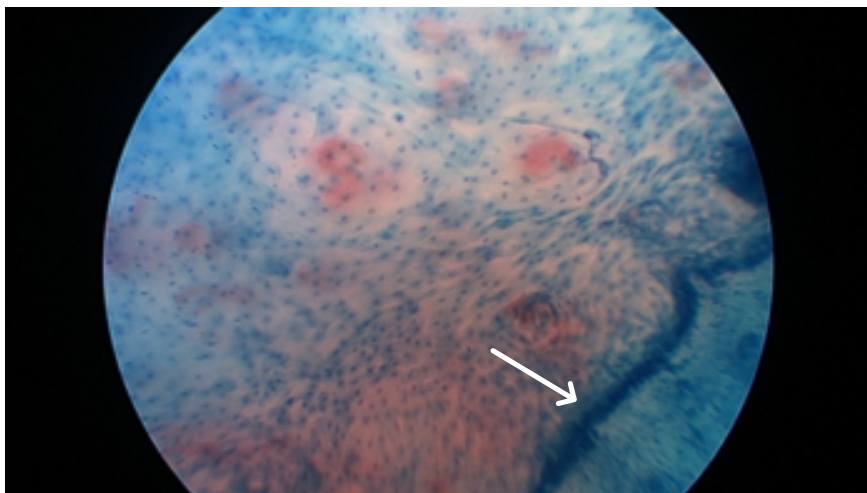


Fig. 29 - Endoscopia de contacto 60X. Margem de lesão ulcerada (seta). As células da mucosa adjacente têm características celulares e vasculares sugestivas de benignidade (esquerda da seta). O leito da ulcera (à direita da seta) não possui epitélio.

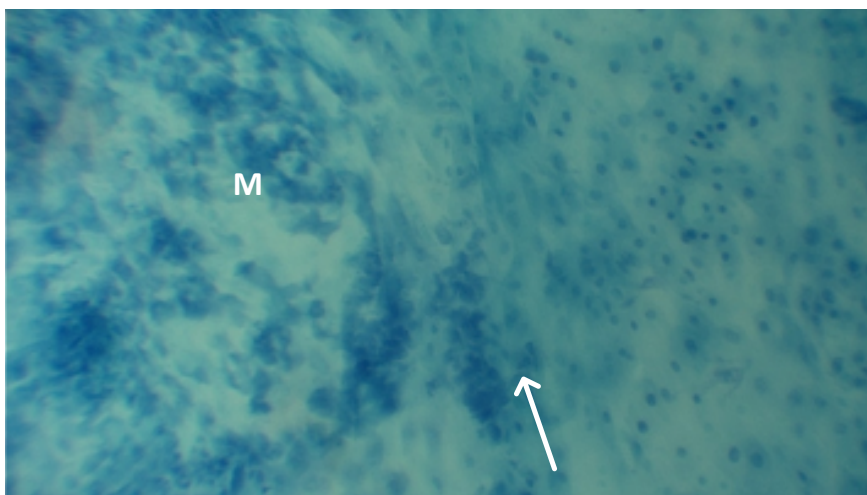


Fig. 30 - Endoscopia de contacto 60X. Observa-se margem (seta) de lesão sugestiva de malignidade (M). As células da mucosa adjacente, à direita, têm características morfológicas sugestivas de displasia com algum grau de anisocariose, sendo igualmente uma área suspeita de malignidade.

Considerando que os carcinomas são doenças de natureza celular, a observação por endoscopia de contacto pode complementar a observação macroscópica acrescentando informação, no domínio microscópico, não só para identificar as lesões, mas também para definir com maior exactidão os seus verdadeiros limites e o grau de envolvimento da restante mucosa oral. A margem microscópica pode não coincidir com a margem

macroscópica. Este facto tem implicações importantes na definição das margens cirúrgicas de segurança e até na determinação da localização da biópsia. O envolvimento da restante mucosa, sem alterações macroscópicas detectáveis na observação clínica clássica, mas detectável por endoscopia de contacto, tem igualmente importância na realização de biópsias, nas decisões terapêuticas e no seu seguimento. Podem também existir alterações microscópicas que revelem diferentes graus da mesma patologia ou focos de malignidade que podem ser responsáveis por recidivas, mesmo em casos de excisões com aparentes margens de segurança. No nosso estudo, encontrámos em alguns casos, ilhotas de células atípicas fora dos limites macroscópicos da lesão (Fig. 31,32).

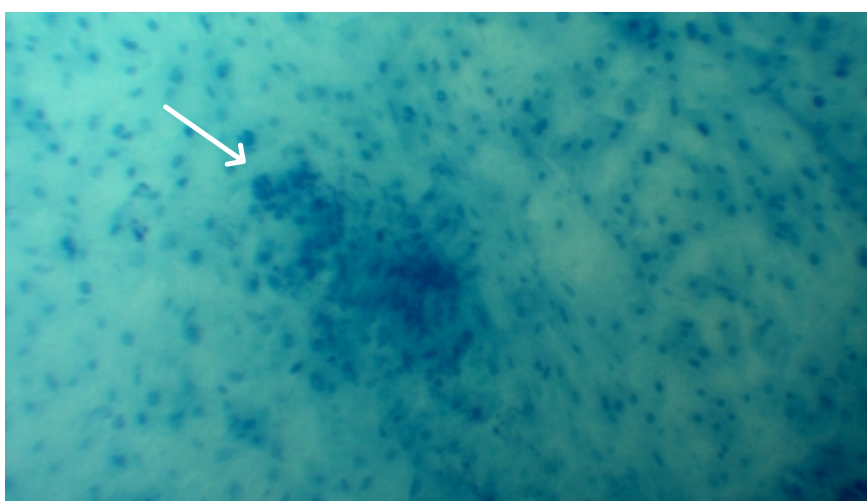


Fig. 31 - Endoscopia de contacto 60X. Ilhota de células com padrão de malignidade (seta) rodeada por células sugestivas de provável inflamação crónica embora possa ser detectada alguma heterogeneidade celular.

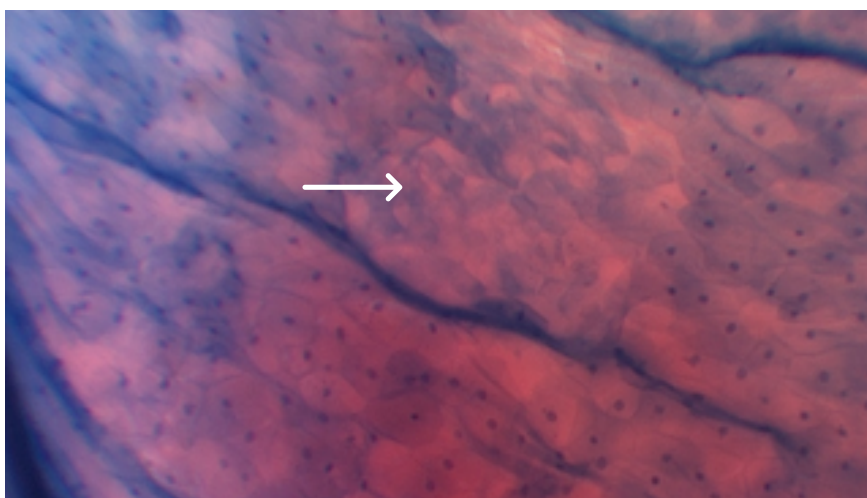


Fig. 32 - Endoscopia de contacto 60X. Ilhota de células queratinizadas sem núcleo (seta) rodeada de células com morfologia normal.

## **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CLÍNICOS PARA REALIZAR O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO**

Apresentamos as respostas dos clínicos que participaram num curso teórico/prático sobre a aplicação da endoscopia de contacto da mucosa oral, durante as primeiras jornadas de Medicina Oral da Faculdade de Medicina de Lisboa.

### **Pergunta 1 - Qual o grau de conhecimento de histologia que considera necessário para ter segurança na interpretação de imagens obtidas por endoscopia de contacto?**

A resposta às três hipóteses colocadas - básico, moderado e profundo - foi:

- básico - 3 clínicos
- moderado - 8 clínicos
- profundo - 1 clínico

### **Pergunta 2 - Qual o grau de risco que julga poder existir para o doente se o diagnóstico por endoscopia de contacto, usado como complemento da clínica e da anatomia-patológica, estiver errado?**

A resposta às cinco hipóteses colocadas - risco nulo, risco quase nulo, risco moderado, risco elevado e risco muito elevado - foi:

- Nulo - 4 clínicos
- Quase nulo - 3 clínicos
- Moderado - 5 clínicos
- Elevado - 0 (zero)
- Muito elevado - 0 (zero)

Foram apresentadas imagens de endoscopia de contacto de 10 casos clínicos e pedido aos 12 clínicos que diagnosticassem benignidade ou malignidade. Segue-se o quadro das respostas em que (1) significa resposta certa e (0) significa resposta errada (Tab.11).

Maligno? Clínico	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9	Caso 10	Total
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10/10 100%
2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9/10 90%
3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9/10 90%
4	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	8/10 80%
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10/10 100%
6	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8/10 80%
7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9/10 90%
8	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9/10 90%
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	9/10 90%
10	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9/10 90%
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10/10 100%
12	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	6/10 60%
Total	11/12 92%	10/12 83%	11/12 92%	9/12 75%	12/12 100%	11/12 92%	7/12 58%	12/12 100%	12/12 100%	10/12 83%	

Tabela 11



CAPÍTULO 4

# DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS



# DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

O cancro da mucosa oral tem uma alta incidência em praticamente todo o globo, associada a um mau prognóstico, com a particularidade deste apresentar grandes assimetrias entre os tumores em estádios mais iniciais (T1-T2), com 80% de sobrevida aos 5 anos e os tumores de estádios mais tardios (T3-T4), com uma taxa de sobrevida de apenas 15% [93]. Estas lesões malignas podem desenvolver-se em áreas de mucosa sãs, ou a partir de lesões ou condições patológicas da mucosa oral, classificadas como potencialmente malignas [43]. O processo de malignização é imprevisível e o seu risco de ocorrência varia conforme o tipo de lesões, não sendo nunca nulo. Este processo pode demorar poucas semanas a muitos anos [43]. Como implicação directa destes factos, ressalta a importância de um diagnóstico precoce e de um seguimento clínico longo e eficaz destes doentes de risco. Estas necessidades justificam a existência de uma técnica não invasiva que possa ser usada na clínica.

O presente estudo, ao demonstrar a capacidade da endoscopia de contacto para o diagnóstico de malignidade, pretende contribuir para a resolução deste problema.

Os resultados deste estudo ajudaram a demonstrar a utilidade da endoscopia de contacto para a realização do diagnóstico de malignidade na mucosa oral. Permitiram também confirmar, na nossa amostragem, a capacidade desta técnica em diagnosticar malignidade, ajudar a definir quais os achados celulares e vasculares a utilizar para realizar esse diagnóstico e a orientar, no sentido de compreender, quais os critérios mais importantes e mais simples para estabelecer, de forma segura, o diagnóstico de malignidade.

Estes resultados podem dividir-se em quatro grupos, tendo em consideração os objectivos a que nos propusemos:

- Avaliar a capacidade da endoscopia de contacto para detectar malignidade na mucosa oral, tendo como teste padrão o exame anatomopatológico.
- Estudar quais os critérios a utilizar para realizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.

- Determinar quais os critérios mais simples, para diagnosticar malignidade, mantendo a mesma segurança diagnóstica.

- Averiguar num grupo de clínicos, sem experiência com a técnica, qual o grau de dificuldade para diagnosticar malignidade, através da observação por endoscopia de contacto.

## CAPACIDADE DA OBSERVAÇÃO POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO PARA DETECTAR MALIGNIDADE

A capacidade discriminativa da endoscopia de contacto para detectar malignidade quando comparada com o exame anatomopatológico, revelou-se muito elevada com uma sensibilidade de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994) e uma especificidade de 97,5% (IC 95% 0,928-0,991). Estes resultados podem classificar-se como muito bons e são reforçados e validados por intervalos de confiança para 95%, consistentes e, no caso da especificidade, por um intervalo muito curto e balizado com valores superiores a 92,8%. A exactidão 97,3% (IC 95% 0,933-0,989), foi igualmente muito elevada e com intervalo de segurança também bastante curto.

A sensibilidade, especificidade e a exactidão do diagnóstico de endoscopia de contacto, quando comparados com o diagnóstico anatomopatológico por biópsia, revelaram valores elevados, em consonância com os valores encontrados na literatura referentes a vários territórios da cabeça e pescoço. Entre os cinco estudos publicados sobre a aplicação da técnica na mucosa oral [25,26,27,28,29] apenas quatro reportam valores de especificidade e sensibilidade, e nenhum deles refere os intervalos de confiança, abordando apenas dois deles os valores preditivos do positivo e do negativo [28,29]. A razão de verosimilhança, que consideramos essencial para avaliar o desempenho de uma técnica, e o valor de concordância Kappa não foram apresentados em nenhum dos estudos publicados. Os valores de sensibilidade referidos oscilaram entre 84% [28] e 96,6% num estudo em que o diagnóstico foi realizado com base, apenas, no padrão vascular [29]. A especificidade revelou valores entre 93% [29] e 100%, sendo que este valor máximo foi registado em dois estudos [26,27]. A ausência de intervalos de confiança, na nossa opinião, dificulta a valorização correcta e completa destas percentagens, prejudicando a extrapolação e a generalização das conclusões; apesar desse pormenor, os valores obtidos são importantes para reforçar as nossas conclusões e permitir alguma extrapolação de resultados.

Em relação aos estudos realizados em outros territórios ORL, já referidos no capítulo da introdução, destacamos o de Cikojevic et al [7] que, com uma amostra de 142 doentes, demonstrou que os resultados da endoscopia de contacto eram superiores aos do exame anatomopatológico extemporâneo realizado durante a cirurgia. Referimos também os estudos de Pak et al [13,14] por apresentarem valores de 100 % para a sensibilidade e especificidade da endoscopia de contacto para diagnosticar tumores malignos na nasofaringe. Todos os restantes estudos apresentaram, também, valores muito elevados de sensibilidade, especificidade e exactidão (quando realizados), facto que se revela igualmente importante para a extrapolação dos nossos resultados.

O valor preditivo do positivo de 90,6% (IC 95% 0,758-0,968), considerado bom, deu consistência aos diagnósticos positivos de malignidade, mostrando uma boa proporção dos diagnósticos verdadeiramente positivos de malignidade em relação ao total dos diagnósticos positivos. O intervalo de confiança é um pouco largo, justificado pela existência de 3 falsos positivos que mais tarde, em dois casos, se vieram a revelar verdadeiros positivos, como demonstraremos. Ainda assim, consideramos um bom valor preditivo do positivo, embora com um intervalo de confiança “artificialmente alargado”. A existência de falsos positivos, desde que, não sejam muito frequentes, não representa um problema importante pois, numa situação de rastreio, apenas significa que a técnica pode detectar casos aparentemente positivos, que terão de ser estudados, ainda que acabem por se revelar negativos. Pode, eventualmente, traduzir um excesso de zelo do exame, em que o único prejuízo para o doente é ter de continuar a investigação até se excluir a existência de doença.

A proporção dos casos de diagnóstico verdadeiramente negativos para malignidade, por diagnóstico por endoscopia de contacto, em relação a todos os negativos para malignidade diagnosticados por anatomopatologia é muito alta, como demonstra o valor preditivo do negativo de 99,1% (IC 95% 0,953-0,998), com um intervalo de confiança, para 95%, muito estreito e balizado por valores muito elevados. Este resultado é muito importante e decisivo para a atribuição de valor à capacidade da endoscopia de contacto, para a realização do diagnóstico de malignidade na mucosa oral. Este valor demonstra que, dificilmente, vamos obter falsos negativos, ou seja, que é pouco provável que uma observação por endoscopia de contacto deixa escapar, sem diagnóstico, uma lesão maligna. Os dois únicos trabalhos que referiram estes valores, reportaram um valor preditivo do positivo de 94% [28] e de 98% [29] e um valor preditivo do negativo de 85% [28] e de 88% [29]. Em ambos os casos não foram apresentados intervalos de confiança. O facto de todos os resultados do valor preditivo

se encontrarem na mesma ordem de grandeza reforça, mais uma vez, as conclusões sobre as capacidades da técnica, contribuindo para a sua generalização.

Realizámos o estudo da razão de verosimilhança por o considerarmos muito importante para avaliar a adequação desta técnica a este tipo de estudo e a esta amostra. A razão de verosimilhança revelou resultados que suportam um desempenho muito elevado da endoscopia de contacto, como teste de diagnóstico de malignidade, quando comparado com o resultado do exame anatomopatológico. A razão de verosimilhança do positivo tem um valor 38,02, o que se considera muito elevado. Este resultado, demonstra a existência de uma maior probabilidade da endoscopia de contacto realizar um diagnóstico positivo para malignidade em indivíduos com doença maligna, do que em doentes sem doença maligna. Portanto, perante um resultado positivo de malignidade por endoscopia de contacto, a probabilidade do diagnóstico anatomopatológico ser também de malignidade é muito elevada.

A razão de verosimilhança do negativo classifica muito bem a endoscopia de contacto como teste de diagnóstico, para esta amostra, pois o seu valor é de 0,03, muito próximo do zero, o que corresponde ao ideal. Este valor, garante que existe uma enorme probabilidade de um diagnóstico negativo para malignidade, realizado por endoscopia de contacto, ser realmente uma lesão sem malignidade. Este facto é muito importante, talvez ainda mais importante do que o de valor da razão de verosimilhança do positivo, já que em testes de rastreio, no qual de alguma forma se enquadra a endoscopia de contacto, a existência de muitos falsos negativos torna muito comprometedor a eficácia destes testes, ou seja, deixam sem identificação muitos casos de doença. Este valor obtido, pela razão de verosimilhança do negativo, vem reforçar o resultado obtido pelo valor preditivo do negativo, conferindo garantia de que dificilmente a endoscopia de contacto deixará de detectar casos de lesões malignas na mucosa oral.

O valor da exactidão avaliou o total de acertos de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos em relação à população estudada. Também aqui o valor é muito elevado - 97,3% (IC 95% 0,933 – 0,989), com um intervalo de confiança para 95%, muito curto e entre valores muito elevados. Estamos assim perante uma técnica que, muito dificilmente, deixa sem identificação uma lesão maligna, ou seja, detecta poucos falsos negativos e também identifica poucos casos de malignidade que não correspondam a lesões malignas, limitando o número de biópsias necessárias para a sua confirmação.

A análise de concordância Kappa, entre o diagnóstico de endoscopia de contacto com o diagnóstico de histologia da biópsia, revelou um índice considerado muito elevado -

0,908 ( $p < 0,001$ ). Este resultado revela, segundo as tabelas de índice de concordância de Landis JR e Koch GG, um índice de quase perfeita concordância entre a endoscopia de contacto e o exame anatomopatológico, que é o teste padrão de referência neste estudo.

Todos estes valores reportados são considerados muito bons para caracterizar o desempenho global da endoscopia de contacto na tarefa de detectar malignidade. A importância dos resultados, já muito bons em valor absoluto, é ainda reforçada quando comparamos a capacidade de diagnóstico de malignidade da endoscopia de contacto com o resultado anatomopatológico, não da biópsia, mas da peça operatória.

Registaram-se três falsos positivos de malignidade obtidos na avaliação de endoscopia de contacto quando comparado com a histologia da biópsia. No entanto, dois destes casos corresponderam a lesões que, devido à suspeita clínica, reforçada pelo diagnóstico de endoscopia de contacto, acabaram por realizar cirurgia para exérese total da lesão. O exame anatomopatológico da respectiva peça operatória, ao revelar malignidade, veio demonstrar que dois dos casos inicialmente considerados falsos positivos, uma leucoplasia da língua numa mulher ex-fumadora e uma lesão exofítica no palato mole de um homem fumador eram, na verdade, verdadeiros positivos.

Estes casos, demonstram a importância que pode ter a avaliação complementar por endoscopia de contacto. Estes dois doentes, com história passada ou actual de tabagismo, apesar de possuírem uma biópsia com resultado anátomo-patológico de benignidade, acabaram por avançar para cirurgia porque, quer a clínica quer a endoscopia de contacto faziam, suspeitar da existência de malignidade.

O terceiro caso de falso positivo, correspondeu a um homem de 56 anos não fumador com uma lesão ulcerada do bordo da língua, cujo diagnóstico da endoscopia de contacto sugeria malignidade. Realizou uma biópsia que não confirmou a suspeita no exame anatomopatológico. Clinicamente, existia a possibilidade de traumatismo dentário, pelo que se optou por regularizar a peça dentária que promovia o traumatismo e esperar, vigiando a evolução. A lesão viria a desaparecer nas seis semanas seguintes ao tratamento odontológico, confirmando-se como falso positivo.

As lesões ulceradas são, de todos os tipos de lesões da mucosa, aquelas em que é mais difícil estabelecer um diagnóstico por endoscopia de contacto. As razões que justificam essa dificuldade relacionam-se com a própria complexidade da realização do procedimento pois a pressão da ponta do endoscópio pode provocar dor e a lesão pode sangrar ligeiramente levando a constantes interrupções da observação. Tendo em



consideração a particularidade da situação, toda a informação deve ser recolhida nas margens da lesão, pois o leito da úlcera não é epitelizada e os vasos são habitualmente difíceis de observar. Em casos de dúvida, devemos optar por um diagnóstico de positividade pois, como já referimos, num exame deste tipo, é melhor tolerado um falso positivo do que um falso negativo, que equivale a uma lesão maligna não detectada.

Neste estudo registou-se um caso de falso negativo. Este caso referia-se não a um tumor epitelial mas a um tumor do conjuntivo, um carcinoma mioepitelial. A endoscopia de contacto não tem acesso ao padrão celular do tecido conjuntivo, não sendo possível nestes casos realizar o diagnóstico. A excepção regista-se nos tumores com alguma dimensão ou com alterações vasculares importantes. No entanto, os tumores do conjuntivo da mucosa oral são muito raros [85] não condicionando, portanto, um número significativo de falsos negativos. Os falsos negativos neste tipo de testes são mais difíceis de tolerar, porém neste estudo existiu apenas um caso, justificado.

Os resultados relativos à capacidade da endoscopia de contacto em identificar áreas de malignidade, quando comparado com o resultado anatomopatológico, permitem-nos acreditar que a informação obtida por endoscopia de contacto é válida para o diagnóstico de malignidade. Isto significa que podemos realizar um varrimento de grandes áreas da mucosa oral, facto que é muito importante, principalmente, se atendermos ao conceito de campo de cancerização [43,47,48,50], que defende que toda a mucosa oral, por estar sujeita aos mesmos factores externos e, por possuir a mesma informação genética, pode desenvolver lesões malignas em qualquer localização. As lesões potencialmente malignas têm por vezes grandes dimensões e podem apresentar-se sob a forma de doenças multifocais (na nossa amostra 11,5%), que têm de ser vigiadas, o que obriga, igualmente, à observação de grandes áreas de mucosa ou, em alternativa, à realização de um grande número de biópsias.

Em relação à caracterização das lesões, a endoscopia de contacto possibilita a realização de um verdadeiro mapeamento da sua distribuição na mucosa, assim como a determinação das suas margens microscópicas, detectando ainda, eventuais focos de malignidade, fora dos limites macroscópicos da lesão. Esta capacidade de detectar malignidade irá igualmente facilitar, conjuntamente com a clínica, a determinação das áreas mais suspeitas onde deve ser realizada a biópsia, por forma a detectar mais eficazmente e com o menor número de biópsias, as lesões malignas.

Os resultados do estudo estatístico, associados aos dados já publicados por outros autores e à informação de carácter mais subjetivo, que recolhemos nas observações

realizadas em todos os casos estudados, permitem-nos considerar que a endoscopia de contacto, nesta amostragem, se revelou uma técnica segura para o diagnóstico de lesões malignas na mucosa oral.

## CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA REALIZAR O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

Para que a endoscopia de contacto possa evoluir e para que seja possível uma boa comparação dos resultados entre equipas de investigação, é importante definir os critérios utilizados para realizar o diagnóstico e, simultaneamente, tentar que a orientação ou estratégia diagnóstica seja o mais simples possível, mantendo a garantia da segurança do diagnóstico.

### PADRÃO CELULAR DE MALIGNIDADE

Tornou-se então necessário avaliar quais os achados celulares e vasculares mais determinantes para a definição do padrão de malignidade celular e vascular e quais os critérios mais simples, que nos garantem uma boa fiabilidade diagnóstica. Simplificar, mantendo a fiabilidade do resultado, significa incentivar e auxiliar os clínicos na utilização da técnica, garantindo uma curva de aprendizagem mais curta.

### ACHADOS OU FACTORES CELULARES UTILIZADOS PARA CONCRETIZAR O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

#### FACTORES MAJOR

- O aspecto geral tecidular de heterogeneidade (anisocariose)
- A forma e dimensão irregulares e aumentadas do núcleo
- A relação núcleo/citoplasma irregular e aumentada
- A hiperqueratose irregular e heterogénea

#### FACTORES MINOR

- O aumento da intensidade e a irregularidade da coloração nuclear
- A identificação de nucléolos
- A identificação de mitoses

Este conjunto de factores apresenta individualmente importância diferente, como foi demonstrado pelo teste de Cochran's Q, ( $p < 0,001$ ) e pela análise de Clusters, salientando-se as diferenças de capacidade de diagnóstico dos factores minor, também explicitas no teste de comparações múltiplas com correcção de Bonferroni. O grupo dos factores celulares selecionados apresenta, em conjunto, uma boa capacidade de diagnóstico. A mais valia desta associação é suportada pela avaliação da consistência interna, por um coeficiente alfa de Cronbach de 0,926, que se considera muito elevado. A análise de clusters também defende esta tese, ao demonstrar a possibilidade de formação de 3 clusters que correspondem, um aos factores celulares major e os restantes dois, aos factores celulares minor. No entanto por razões clínicas devemos considerar e continuar a utilizar todos em conjunto. A remoção de algum dos achados celulares não se revelou benéfica, como confirmado pelo coeficiente alfa de Cronbach if item deleted. Porém, também foi confirmado que se não realizarmos a avaliação dos últimos factores da árvore de decisão, detecção de mitoses, nucléolo, e alteração da cor dos núcleos, não diminuimos de forma importante a capacidade de detecção de malignidade, ainda que se possa perder informação complementar sobre a situação individual da lesão. Este facto é importante, pois permite aos clínicos com menos experiência realizar apenas a avaliação dos primeiros factores, que têm desde logo a tripla vantagem de, serem os primeiros e os mais fáceis de avaliar e serem ainda os mais determinantes para o diagnóstico. Assim este procedimento de diagnóstico simplificado poderá ser realizado sem comprometer a validade do resultado final.

## HETEROGENEIDADE CELULAR - ANISOCARIOSE

A existência de heterogeneidade celular é o primeiro achado a abordar e o mais determinante para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto, como é suportado pelos resultados de uma sensibilidade de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994) e de uma especificidade de 97,5% (IC 95% 0,928-0,991), quando comparado com o diagnóstico anatomopatológico.

O valor preditivo do positivo de 90,6% (IC 95% 0,758-0,968), confere uma muito boa proporção entre as lesões com heterogeneidade celular e os casos de diagnóstico de malignidade. O valor preditivo do negativo de 99,1% (IC 95% 0,953-0,998), confirma que as lesões sem heterogeneidade celular dificilmente serão casos de malignidade.

A exactidão de 97,3% (IC 95% 0,933-0,989), confirma uma muito boa concordância entre os verdadeiros positivos e negativos para heterogeneidade com os verdadeiros positivos

e negativos para o diagnóstico de malignidade, com um valor próximo de 100% e com um intervalo de confiança muito estreito, o que valoriza ainda mais o resultado.

A razão de verosimilhança de 38,22 é muito alta, demonstrando uma probabilidade muito mais elevada de observação de heterogeneidade celular em lesões com diagnóstico de endoscopia de contacto de malignidade do que em lesões com diagnóstico de benignidade.

A análise de concordância Kappa revelou um índice de 0,922  $p < 0,001$  que é considerado muito elevado. Segundo as tabelas de índice de concordância de Landis JR e Koch GG, revela uma quase perfeita concordância entre a presença de heterogeneidade celular e o diagnóstico de malignidade.

Todos os casos de diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto apresentam heterogeneidade celular. Como é um achado celular fácil de detectar, mesmo sem qualquer conhecimento de histopatologia, e o primeiro passo na árvore de decisão na observação por endoscopia de contacto, acreditamos ser possível a qualquer clínico obter uma primeira impressão diagnóstica de malignidade, com uma curva de aprendizagem curta.

## FORMA, DIMENSÕES E LIMITES NUCLEARES

Dirigimos agora a avaliação para aspectos mais celulares e menos tecidulares, onde começámos por avaliar as alterações da forma dos núcleos. Os valores obtidos são na íntegra sobreponíveis aos valores obtidos para a heterogeneidade celular. Esta sobreposição e a falta de independência, entre estas duas variáveis era espectável, uma vez que a heterogeneidade é a expressão tecidular do conjunto das alterações celulares individuais das células desse tecido, com núcleos de forma, dimensão e limites irregulares (anisocariose). No entanto, a detecção de alterações da forma nuclear, assegura que a heterogeneidade identificada no primeiro passo da observação não é um artefacto e corresponde, efectivamente, a um aspecto de anisocariose, ou seja, à existência, no mesmo tecido, de células com núcleos de forma e dimensão não normal e muito variável. A variação da forma nuclear deverá, em sentido inverso, ser confirmada pela presença de heterogeneidade, pois significa que as alterações da forma são generalizadas e sobretudo, apresentam grande variabilidade (anisocariose). A ausência dessa variabilidade, pode sugerir estarmos perante um processo somente displásico ou mesmo unicamente de inflamação crónica.

## RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA

O aumento da relação núcleo-citoplasma associado à irregularidade e à variabilidade dos seus valores, é uma consequência directa da variabilidade das dimensões dos núcleos. Considerando que não há modificação da dimensão da célula, o aumento da área nuclear traduz-se por uma diminuição relativa e absoluta da área citoplasmática. Justifica-se então, que a exactidão de 97,3% (IC 95% 0,933-0,989), a sensibilidade de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994) e a especificidade de 97,5% (IC 95% 0,928-0,991), detectados em relação a esta alteração celular, possuam valores semelhantes aos obtidos para a alteração da forma nuclear. Por consequência, é aplicável o mesmo raciocínio em relação aos valores referentes à heterogeneidade celular, pois o facto da relação núcleo/citoplasma ser muito inconstante, nos casos de malignidade, traduz-se num aspecto geral de irregularidade e heterogeneidade.

Assim se explica a interdependência dos três achados celulares, que devem ser considerados factores major de diagnóstico. Devemos avaliar os três achados em conjunto, e não individualmente, apesar da sobreposição dos resultados, pois a avaliação dos três factores celulares aumenta a garantia do diagnóstico, confirmando e potenciando as alterações detectadas em cada um deles, garantindo, por exemplo, que uma imagem de heterogeneidade é real e não um artefacto.

Para considerarmos existir diagnóstico de malignidade, deverão detectar-se pelo menos dois factores celulares major em que um deles deverá ser, obrigatoriamente, a heterogeneidade celular, que reflecte um pleomorfismo nuclear suspeito (anisocariose).

## COLORAÇÃO NUCLEAR

A detecção de núcleos com coloração irregular apresentou, nos resultados deste estudo, valores elevados de sensibilidade de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994), refletindo o facto de, em quase todos os casos de malignidade, existir coloração irregular dos núcleos. Os resultados da especificidade foram mais baixos, 75,4% (IC 95% 0,669-0,823) e, com intervalos de confiança mais amplos, o que espelha o facto de em algumas situações benignas, como em processos inflamatórios crónicos, também poder existir aumento da intensidade da coloração nuclear e, em alguns casos, poder mesmo ser detectada alguma irregularidade.

O valor preditivo do positivo foi bastante inferior ao dos factores anteriores com apenas 50,0% (IC 95% 0,375-0,625). Muitos verdadeiros positivos de alteração da coloração não correspondem a verdadeiros positivos de malignidade, sendo representados pelos já referidos casos de inflamação crónica. Em contraste, o valor preditivo do negativo é muito elevado, 98,9% (IC 95% 0,940-0,998) e com um intervalo muito reduzido, o que suporta a tese de que as lesões que não tem alteração da coloração dificilmente são malignas, pois existe uma muito boa proporção dos verdadeiros negativos, lesões que não têm alteração da coloração, em relação a todos os negativos, ou seja, em relação aos que não têm um diagnóstico de malignidade.

A razão de verosimilhança do positivo é relativamente baixa, 3,933. Sendo superior a 1, este valor significa que um resultado positivo para alteração da coloração tem ainda assim maior probabilidade de ser um caso de malignidade, embora essa probabilidade seja muito inferior, quando comparada com a associada à heterogeneidade, à alteração da forma nuclear ou à alteração da relação núcleo/citoplasma, que considerámos factores major.

O valor de concordância Kappa revelou um índice de 0,55  $p < 0,001$ , inferior ao dos factores que consideramos major, mas ainda assim, com alguma concordância entre as variações de coloração e o diagnóstico de malignidade. Segundo a tabela de Landis JR e Koch GG, este valor representa uma concordância moderada entre as alterações de coloração e o diagnóstico de malignidade.

A análise de Clusters também contribui para a classificação da alteração da coloração nuclear, ao agrupar este achado celular com os outros factores minor, sugerindo um contributo semelhante para o diagnóstico.

A coloração nuclear é o achado celular com maior subjectividade de avaliação. Para tentar limitar a margem de erro, consideramos não só o aumento da intensidade da coloração mas também a variação e a irregularidade dessa coloração. Nos casos de dúvida, devemos considerar existir discromasia. Tal como em todas as técnicas de rastreio, é melhor errar por excesso, levando a falsos positivos, do que errar por defeito aumentando os falsos negativos e, assim, deixar passar situações de malignidade sem diagnóstico.

A detecção e classificação da alteração da coloração dos núcleos é, provavelmente, o achado celular e vascular que mais beneficiaria com a avaliação e processamento das imagens por um programa informático.

Considerando todos os resultados desta variável, a alteração da cor do núcleo deverá ser considerado um factor celular menor.

## NUCLÉOLOS VISÍVEIS

Podemos considerar a existência de nucléolos visíveis um achado celular importante para o diagnóstico de malignidade, quando considerado em conjunto com os outros factores celulares. No entanto, se for considerado de forma isolada, este factor tem uma sensibilidade, uma especificidade e um factor preditivo do positivo e do negativo que confirmam a sua pouca importância para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.

A sensibilidade em relação ao diagnóstico de malignidade foi elevada, embora com um bom intervalo de confiança, apenas um pouco alargado de 96,7% (IC 95% 0,0833-0,994) e uma especificidade mais baixa e com um intervalo de confiança bastante alargado e relativamente baixo 73,7% (IC 95% 0,651-0,808), revelando que embora se observem nucléolos em quase todos os casos de malignidade, podem também, com alguma frequência, ser observados em situações não malignas. A exactidão apresenta-se também, como um bom valor absoluto mas relativamente baixo em relação aos outros factores celulares, 78,4% (IC 95% 0,711-0,842), denotando assim uma concordância não muito elevada entre a observação de nucléolos e a existência de malignidade.

O valor preditivo do positivo foi de 48,3% (IC 95% 0,362-0,607), o mais baixo entre todos os achados celulares, o que revela a mais baixa proporção entre os verdadeiros positivos para a observação de nucléolos com todos os positivos para o diagnóstico de malignidade, confirmando assim a noção empírica que já tínhamos da prática clínica, onde observamos muitos casos de nucléolos em lesões benignas ou mesmo na mucosa sã. O valor preditivo do negativo de 98,9% (IC 95% 0,938-0,998), revela uma boa proporção em relação aos verdadeiros negativos para a observação do nucléolo, em relação a todos os doentes negativos para o diagnóstico de malignidade, reforçando a ideia de que quando não observamos nucléolos dificilmente estaremos perante uma lesão maligna.

A razão de verossimilhança do positivo foi também a mais baixa de todos os achados celulares com um valor de 3,680, significando que quando observamos nucléolos, existe uma probabilidade maior de existir malignidade, ainda que não seja uma probabilidade muito significativa quando comparada com a dos factores maior.



A concordância entre a detecção de nucléolos e o diagnóstico de malignidade foi avaliada com o índice Kappa que revelou o valor mais baixo dos achados celulares de 0,493  $p < 0,001$ , o que representa, segundo a tabela de Landis JR e Koch GG, uma concordância moderada.

Podemos considerar que a observação isolada de nucléolos é um factor não determinante, e de importância menor para o diagnóstico de malignidade. A identificação de nucléolos deve ser, por isso, considerada um factor menor no diagnóstico de malignidade.

## OBSERVAÇÃO DE MITOSES

A detecção de mitoses está incluída no grupo dos achados celulares para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. A sua sensibilidade para o diagnóstico de malignidade foi de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994) revelando-se elevado, embora com um intervalo de confiança um pouco alargado, e o valor da especificidade mais baixo de 79,7% (IC 95% 0,715-0,859), revelando uma especificidade boa, mas inferior à registada nos achados celulares major, confirmando a hipótese já considerada, com base nas observações, de que as mitoses podem ser observadas em situações não malignas. A exactidão de 83,1% (IC 95% 0,763-0,883), não sendo uma exactidão desprezível, é muito inferior à obtida para os achados celulares major.

O valor preditivo do positivo foi o mais baixo com 54,7% (IC 95% 0,415-0,673), o que revela uma não muito boa proporção entre os verdadeiros positivos para a observação de mitoses e os casos verdadeiros de malignidade, ou seja, em alguns casos observam-se mitoses e não há malignidade. O valor preditivo do negativo é bastante elevado e com um intervalo de confiança bastante estreito de 98,9 (IC 95% 0,943-0,998), o que significa que existe uma boa proporção entre os verdadeiros negativos para observação de mitoses e os casos verdadeiros de não malignidade ou seja, não se observando mitoses há uma forte probabilidade de não estamos perante uma área de malignidade.

A razão de verosimilhança do positivo, que determina a probabilidade de uma lesão onde detectamos mitoses ser maligna é 4,75, que sendo um valor superior a 1, significa que existe maior probabilidade de malignidade quando observadas mitoses, embora não seja muito significativa, nomeadamente, quando comparada com a associada aos factores major. Comparando, por exemplo, a concordância da observação de núcleos de forma alterada com a probabilidade de uma lesão ser maligna, podemos afirmar

com base nestes resultados, que esta probabilidade é cerca de 10 vezes maior do que a probabilidade de ser maligna, se observamos mitoses.

O valor de concordância do índice Kappa de 0,58  $p < 0,001$ , revelou uma concordância moderada entre a observação de mitoses e o diagnóstico de malignidade, segundo a tabela de Landis JR e Koch GG .

Apesar da existência de mitoses ser detectada em quase todos os casos de malignidade, é possível observar mitoses em situações normais, bem como em casos de inflamação crónica.

A análise de Clusters agrupa este achado celular com os outros achados minor ou próximo deles.

Este factor celular tem uma importância e um significado muito semelhante ao da observação de nucléolos. Em conjunto com os outros achados celulares, é um factor importante para o diagnóstico, tendo sido considerado pelo teste da árvore de decisão o factor minor mais importante.

## HIPERQUERATOSE IRREGULAR

Seguindo a estratégia proposta na árvore de decisão deste estudo, quando não conseguimos observar núcleos e não estamos numa região de mucosa mastigatória, a hiperqueratose é sempre considerada patológica. Devemos avaliar as suas características morfológicas porque o tipo de hiperqueratose é um bom indicador de malignidade, como demonstra a sua alta sensibilidade de 100% (IC 95% 0,839-1), embora com uma especificidade um pouco mais baixa, de 93,1% (IC 95% 0,848-0,970), o que seria expectável pois a hiperqueratose irregular é detectada igualmente em alguns casos benignos.

O valor preditivo do positivo de 80% (IC 95% 0,609-0,911), revela-se um bom resultado embora um pouco inferior ao dos outros factores celulares de diagnóstico major. A proporção de verdadeiros positivos em que detectamos hiperqueratose de aspecto irregular é apenas moderadamente boa, em relação aos verdadeiros casos de malignidade, confirmando que, em alguns casos, se observa hiperqueratose com algum grau de irregularidade em situações benignas. O valor preditivo do negativo é máximo e tem um intervalo de confiança estreito de 100% (IC 95% 0.946-1), mostrando uma muito

boa proporção entre os verdadeiros casos em que não observamos hiperqueratose irregular e todos os casos em que não há malignidade. A exactidão é de 94,6% com um intervalo de confiança relativamente estreito (IC 95% 0,879-0,977), demonstrando uma óptima concordância entre a identificação de hiperqueratose irregular e o diagnóstico de malignidade.

A razão de verosimilhança do positivo que representa a probabilidade de o diagnóstico de uma lesão ser maligna, se observarmos hiperqueratose irregular é boa, 14,4, mas ainda assim, cerca de 3 vezes menor do que a registada nos outros factores major de diagnóstico de malignidade.

O índice de concordância Kappa é de 0,87 ( $p < 0,001$ ), considerado muito elevado, revelando quase concordância absoluta entre a detecção de hiperqueratose irregular e o diagnóstico de malignidade.

Podemos concluir que, nas situações em que não é possível observar núcleos das células em nenhuma região da lesão maligna, a avaliação do tipo de hiperqueratose pode revelar-se muito importante e a sua alta sensibilidade leva-nos a considerá-la um critério major no diagnóstico de malignidade. Este achado celular participou no diagnóstico que constituiu um dos aparentes falsos positivos do nosso estudo. Tratava-se de uma lesão leucoplásica da língua, em que o exame anatomopatológico da biópsia, diagnosticou lesão benigna. Em contraste a endoscopia de contacto observou aspectos de hiperqueratose heterogénea que sugeriam tratar-se de um padrão de malignidade. Este facto, associado a algum grau de suspeição clínica de malignidade, levou à decisão de realizar excisão da lesão, tendo o exame anatomopatológico da peça confirmado as suspeitas da clínica e da endoscopia de contacto, ao diagnosticar um carcinoma. A análise de Clusters agrupa esta achado celular aos factores major.

A hiperqueratose funciona como um segundo vector no diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto, sendo os outros dois as alterações nucleares e os transtornos da microvascularização. Estes três vectores funcionam sempre em conjunto para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto podendo, conforme o tipo de lesão, cada um deles ter mais ou menos preponderância no diagnóstico final. A hiperqueratose, que se afigurava como um problema por não permitir a observação dos núcleos pode, afinal, transmitir informação muito relevante para o diagnóstico de malignidade.

Em conclusão, quando não é possível observar núcleos, devemos avaliar o tipo de hiperqueratose que constitui um braço complementar ou alternativo no nosso protocolo ou árvore de decisão. Nestes casos, o diagnóstico de malignidade é aceite apenas com a identificação de um factor major embora deva, de preferência, mas não obrigatoriamente, ser confirmado com um factor do padrão vascular para o diagnóstico de malignidade.

## PADRÃO VASCULAR DE MALIGNIDADE

A obtenção das imagens celulares por endoscopia de contacto é, normalmente, fácil e rápida mas, em alguns casos especiais, pode ser difícil obter informação a nível celular. De modo geral, podemos confrontar-nos com três situações possíveis:

- Lesões ulceradas onde não é possível observar células, pois no leito da úlcera não há epitélio, sendo por isso o padrão celular avaliado apenas nas margens da lesão (Fig.18).
- Lesões mais friáveis que nos obrigam a cuidados especiais na realização do exame, de forma a impedir pequenas hemorragias que condicionam o aparecimento de sangue no campo de observação, que em muito dificulta a observação por endoscopia de contacto.
- Nos casos de hiperqueratose, nos quais não é possível observar os núcleos, podendo mesmo nem se individualizar as células. Esta limitação pode ser ultrapassada através da observação e avaliação da própria hiperqueratose e da microcirculação na lesão, nas suas margens ou áreas adjacentes. No entanto, é quase sempre possível recolher algum grau de informação dos dois grandes ramos da árvore de decisão, que correspondem ao padrão celular e ao padrão vascular.

## FACTORES OU ACHADOS VASCULARES UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

A avaliação do padrão vascular corresponde ao segundo grande ramo de diagnóstico da árvore de decisão estabelecida para o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. Não é um ramo alternativo mas sim associado; deve ser sempre feita a avaliação do padrão celular e vascular, uma vez que ambos dão uma contribuição muito válida, embora com variações dependendo do tipo de lesão, do estado evolutivo ou da situação inflamatória. Para se definir o diagnóstico de malignidade bastará que

um dos padrões celular ou vascular seja positivo para malignidade, no entanto, os seus resultados são quase sempre convergentes. Neste estudo houve convergência em todos os casos, embora com peso diferente para o diagnóstico final.

#### FACTORES MAJOR:

- Heterogeneidade da arquitectura vascular
- Alterações da forma e ectasias dos vasos
- Observação de microtromboses

#### FACTORES MINOR.

- Observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos

Este conjunto de factores vasculares, associados em grupo com o objectivo de realizar o diagnóstico de malignidade, apresentam uma óptima consistência interna, suportada por um coeficiente de alpha de Cronbach de 0,926, que se considera muito elevado. A avaliação da alteração da capacidade diagnóstica, após a remoção de um ou mais factores, revelou não existir vantagem aparente (alpha de Cronbach if item deleted). Feitas as comparações múltiplas com correcção de Bonferroni conclui-se que o achado vascular mais dissemelhante foi a observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos. No entanto, este factor deve manter-se no grupo apesar de ser considerado do tipo minor. Acreditamos que não só ajuda a complementar o diagnóstico e a confirmar situações de fronteira, como num futuro próximo poderá ter importância para outro tipo de classificação das lesões, nomeadamente, para ajudar a prever o grau de invasibilidade dos tumores malignos.

Alguns casos de inflamação crónica ou estados de pós radioterapia podem condicionar fenómenos de resposta vascular com hiperplasia e mesmo de aparecimento de alguma irregularidade vascular. Ainda assim, a heterogeneidade geral é muito menos intensa, pois estas alterações da forma são comuns à quase totalidade dos vasos. Habitualmente, a heterogeneidade da arquitectura vascular significa malignidade, como é suportado pelos valores de sensibilidade de 96,7% (IC 95% 0,833-0,994), de especificidade de 97,5% (IC 95% 0,928-0,991) e de valor preditivo do positivo de 90,6% (IC 95% 0,758-0,968). Este resultado sugere que quando detectamos uma arquitectura vascular heterogénea numa lesão, existe uma grande concordância com todos os positivos para malignidade, detectados pelo exame anatomopatológico. O valor preditivo do negativo

de 99,1% (IC 95% 0,953-0,998), defende a ideia de que a percentagem de casos em que não é detectada heterogeneidade vascular, em relação a todos os casos em que não há malignidade diagnosticada pelo exame anatomopatológico, é muito grande. O acerto de exactidão foi de 97,3% (IC 95% 0,933-0,989), o que garante uma óptima concordância entre os casos de detecção positiva e negativa deste factor e o total dos positivos e negativos para o diagnóstico de malignidade por exame anatomopatológico.

A razão de verosimilhança do positivo foi também muito elevada de 38,22, significando que, ao observarmos heterogeneidade vascular, a probabilidade de se tratar de um caso de malignidade confirmado pela Anatomia Patológica é muito elevado.

O índice de concordância Kappa revelou concordância quase absoluta pelas tabelas de Landis JR e Koch GG. Estes resultados defendem a classificação deste factor vascular como major, sendo também o primeiro a ser avaliado durante a execução de endoscopia de contacto, obedecendo à nossa estratégia desenhada na árvore de decisão.

## ALTERAÇÃO DA FORMA DOS VASOS

A alteração da forma dos vasos condiciona directamente o aspecto geral de heterogeneidade da arquitectura vascular. No entanto não encontramos uma sobreposição dos resultados como a que ocorre entre a heterogeneidade celular e a alteração da forma dos núcleos. Pois, como já referimos, algumas patologias inflamatórias e, principalmente, os casos após radioterapia, condicionam dismorfismo vascular. Este pode por vezes adquirir formas próximas da neoangiogénese tumoral, mas como a alteração é generalizada e semelhante em todos os vasos, não se traduz por um aspecto de heterogeneidade. Este facto é reflectido numa sensibilidade boa, de 83,3% (IC 95% 0,664-0,927), porém, mais baixa do que na heterogeneidade. A especificidade apresenta um valor muito elevado suportado por um bom intervalo de confiança de 94,1% (IC 95% 0,883-0,971).

A alteração da forma dos vasos é mais sugestiva de malignidade quando as formas são mais complexas e diferentes entre si. Os dismorfismos vasculares também se verificam associados aos fenómenos inflamatórios crónicos e aos estados de pós radioterapia. No entanto, nestes casos as alterações da forma são, normalmente, menos aberrantes, persistindo alguma semelhança residual entre a forma original e a forma patológica. Ainda assim, a razão de verosimilhança do positiva foi de 15,5, que revela uma boa probabilidade de uma lesão ser maligna se apresentar alteração da forma dos vasos,

e o índice de concordância Kappa de 0,848. Este valor é também bastante elevado, considerado concordância quase absoluta (Landis JR, KochGG). Na análise de clusters este achado celular é agrupado com os outros factores vasculares major.

A alteração da forma vascular é considerada um factor de diagnóstico major.

## OBSERVAÇÃO DE MICROTROMBOSES

A presença de microtromboses foi considerado um factor major pois, apesar de apresentar um valor de sensibilidade baixo de 73,3% (IC 95% 0,556-0,858), em relação aos outros factores major, todos os outros valores de capacidade discriminativa e preditiva, como a especificidade de 98,3% (IC 95% 0,949-0,995), a razão de verossimilhança do positivo de 43,26 o valor preditivo do positivo de 91,7% (IC 95% 0,742-0,977) e o valor preditivo do negativo de 93,5% (IC 95% 0,878-0,967) e a exactidão de 93,2% (IC 95% 0,880-0,963), estão em consonância com este grupo. Possui igualmente, um índice de concordância Kappa de 0,809 ( $p < 0,001$ ) que está na fronteira entre a concordância substancial e a concordância quase perfeita, segundo as tabelas de Landis JR e Koch GG.

Na análise de Clusters está integrado no grupo dos factores major e é o factor que mais baixa a capacidade diagnóstica do grupo (Cronbach's alfa) quando é removido do conjunto (Cronbach if item deleted). Na prática, o aparecimento de microtromboses nos vasos é muito sugestivo de malignidade, com excepção de casos de pós radioterapia ou de algumas inflamações crónicas, em que devemos estar atentos pois a sua positividade isolada não deve ser considerada como diagnóstica, já que pode conduzir-nos a um falso positivo. No entanto, é considerado um bom indicador de malignidade. O grau de experiência com a técnica poderá condicionar a avaliação deste achado celular, pois é importante observar a cinética do fluxo sanguíneo e controlar a pressão da ponta do endoscópio que deve ser o mais estável e adequada possível, para não interferir com o resultado.

## GLÓBULOS VERMELHOS FORA DOS VASOS

A observação de glóbulos vermelhos extravasados, sugerindo friabilidade das paredes dos vasos é um dos factores utilizados para o diagnóstico de malignidade. Embora seja um factor minor, este factor vascular é importante no grupo, pois ao testarmos a sua remoção (Cronbach's alpha if item deleted) não aumentamos a capacidade da endoscopia de contacto de detectar malignidade.



A sensibilidade deste factor para o diagnóstico de malignidade é baixa, 60% (IC 95% 0,423-0,754), sugerindo que não se observam glóbulos vermelhos fora dos vasos em todos os casos de malignidade. Em contraste, obtemos valores máximos para a especificidade de 100% (IC 95% 0,968-1), com um valor preditivo do positivo, também máximo de 100% (IC 95% 0,824-1), confirmando que só se observam glóbulos vermelhos extravasados nos casos de malignidade. O valor preditivo do negativo é bom, sendo de 90,8 (IC 95% 0,846-0,946) a exactidão foi de 91,9 % (IC 95% 0,864-0,953) revelando um valor bastante bom. O índice de concordância Kappa foi de 0,656  $p < 0,001$ , sugerindo concordância substancial segundo as tabelas de Landis JR e Koch GG. Foi o valor mais baixo de todos os factores vasculares o que reforça a sua definição como factor minor de diagnóstico.

Em conclusão, este achado vascular isolado, é um factor minor pois não é um marcador muito sensível de malignidade, uma vez que muitos casos de carcinoma não têm friabilidade, logo, não se observam glóbulos vermelhos extravasados. Porém, todos os casos de observação de glóbulos vermelhos fora dos vasos corresponderam a casos de malignidade.

No padrão vascular deve ser considerado o diagnóstico de malignidade quando tivermos pelo menos dois factores major positivos devendo, obrigatoriamente, um deles ser o aspecto heterogéneo e irregular da arquitectura vascular.

## CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO

Após as observações realizadas, criámos uma hipótese para definir um protocolo de realização da endoscopia e uma árvore de decisão que permitisse orientar e sistematizar o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto. Os resultados obtidos neste estudo e nesta amostra, ajudaram a suportar esta proposta, confirmando a importância individual e em grupo dos elementos escolhidos para a integrar.

Todas as lesões, devem ser avaliadas pelos dois ramos principais da árvore de procedimento e decisão, que são a avaliação dos padrões celular e vascular. Para aceitarmos o diagnóstico de malignidade bastará que um deles seja positivo (fluxograma 1).

No padrão celular o diagnóstico de malignidade é considerado quando dois dos factores major e um factor minor são detectados, devendo um deles ser, obrigatoriamente,

a heterogeneidade geral celular (anisocariose). Os factores minor têm um papel de reforço e confirmação de diagnóstico e poderão num futuro próximo ajudar a classificar o tipo de lesão maligna. No padrão celular considera-se, no entanto, uma excepção, quando não são observáveis núcleos, a identificação de hiperqueratose irregular, factor major de diagnóstico, é suficiente para realização do diagnóstico de malignidade.

No padrão vascular o diagnóstico de malignidade deverá estar dependente da confirmação de dois factores major, em que um deles deverá ser, obrigatoriamente, a heterogeneidade da arquitectura vascular. O factor minor tem o papel de confirmar o diagnóstico. Neste caso, tem inclusivamente uma especificidade de 100% e poderá vir a ser utilizado para estadiar as lesões malignas.

## CRITÉRIOS MAIS SIMPLES PARA DIAGNOSTICAR MALIGNIDADE MANTENDO A SEGURANÇA DIAGNÓSTICA

Aparentemente, o nível de decisão de diagnóstico de malignidade pode estabelecer-se com uma boa eficácia após a detecção de heterogeneidade celular ou vascular, o que nos leva a propor que este critério simplificado possa ser usado por clínicos numa fase inicial de utilização da técnica.

No âmbito da árvore de diagnóstico, proposta neste estudo, estes dois factores major têm obrigatoriamente de ser positivos, para se concretizar o diagnóstico de malignidade. Quando avaliamos a sua capacidade isolada para efectuar o diagnóstico de malignidade obtivemos óptimos valores discriminativos e preditivos e, ainda um valor de índice Kappa de quase concordância absoluta.

A avaliação deste achado celular ou vascular é realizada logo no começo do procedimento. Este facto facilita a utilização da endoscopia de contacto para detectar malignidade por clínicos com pouca experiência com a técnica e pode ajudar a prever um menor tempo de adaptação, sugerindo uma curva de aprendizagem curta, com garantia de melhores resultados.

O teste da árvore de diagnóstico demonstra também que praticamente todos os casos de malignidade são detectados logo no primeiro nível de decisão, os outros níveis servirão para acrescentar pouco, em relação à decisão do diagnóstico de malignidade e à confirmação deste primeiro nível.

O erro de diagnóstico baseado nesta estratégia passará sempre por falsos positivos e não por falsos negativos. Assim, esta estratégia mantém sempre altas sensibilidades, como se pretende quando queremos detectar malignidade e quando testamos a utilização da endoscopia de contacto como uma técnica complementar da clínica e das biopsias, para diagnóstico anatomopatológico. Esta actuação como técnica complementar justifica a quase isenção de risco para o doente, mesmo quando a endoscopia de contacto está a ser executada por um clínico sem preparação anatomopatológica específica. Nesse sentido, perante uma lesão, a decisão sobre a orientação dos pontos a biopsar, depende do aspecto macroscópico e da clínica. A endoscopia de contacto não vai nunca contrariar o diagnóstico clínico, podendo complementá-lo ao sugerir outra ou outras áreas para biopsar. Um diagnóstico errado de endoscopia de contacto nunca vai diminuir a eficácia da decisão tomada só com a clínica, podendo apenas não acrescentar nada de novo.

## VANTAGENS DA ENDOSCOPIA DE CONTACTO NO DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE

As vantagens da realização de endoscopia de contacto na consulta, como complemento da clínica, são muitas e foram sendo descritas e suportadas pelos resultados ao longo deste estudo.

A endoscopia de contacto requer pouco material para a sua execução. O único instrumento mais específico exigido é o endoscópio de contacto, que em termos de custos monetários representa um valor aproximado de dois endoscópios clássicos para observação macroscópica.

A endoscopia de contacto tem vantagens factuais como permitir, *in vivo* e de uma forma não invasiva, o acesso à dimensão microscópica das mucosas, permitindo observar células, vasos e ostia de glândulas. Permite observar o núcleo e o citoplasma das células. Possibilita o acesso a estas estruturas não só no domínio da morfologia, mas também da histofisiologia sendo possível observar no seu ambiente natural, as células a descamar, os glóbulos vermelhos na corrente sanguínea e os ostia das glândulas a abrir e a fechar durante a fase excretora. Estas actividades dinâmicas e fisiológicas dos tecidos são difíceis de avaliar *in vivo* com outras técnicas de observação. A endoscopia de contacto permite observar com algum rigor, as características morfológicas do núcleo e do citoplasma. Esta observação morfológica, ainda que muito menos completa do que a obtida pela histologia, permite observar as células vivas, no seu meio natural e, por isso, com menos artefactos técnicos.

Através do varrimento da superfície da mucosa com a ponta do endoscópio podemos avaliar grandes extensões em poucos minutos. Esta é uma vantagem muito importante, se pensarmos que a mucosa da boca apresenta frequentemente lesões multifocais ou extensas (11,5% na nossa amostra) e que o conceito de doença oncológica ou campo de cancerigénese [43,47,48,49] implica um controlo geral de uma mucosa cujas células têm a mesma informação genética e estão sujeitas, de forma muito semelhante, aos factores externos. Com excepção dos traumatismos, normalmente dentários, mas também com práticas de hábitos tabágicos pouco comuns na Europa mas, frequentes na América Latina, como fumar com o cigarro invertido no interior da boca [55], todos os outros factores externos como o tabaco e o álcool vão actuar em toda a mucosa oral, aumentando a probabilidade de aparecimento de células neoplásicas malignas em qualquer localização.

Os resultados deste estudo mostraram a existência de ilhotas de células atípicas fora dos limites macroscópicos das lesões. Este facto sugere que a presença de uma lesão maligna pode apenas significar que estamos perante uma área em que uma doença ou condição que afecta toda a mucosa está naquela localização mais avançada, e por isso com alterações fenotípicas, microscópicas e macroscópicas detectáveis. Esta noção engloba-se no conceito de campo de cancerização, descrita na última monografia de tumores da cabeça e pescoço da OMS [43,47,48].

A observação por endoscopia de contacto pode ser repetida, sempre que necessário, sem que isso implique uma agressão para o doente, quer por não provocar qualquer grau significativo de dor, quer por não danificar os tecidos. Esta é uma vantagem muito importante, principalmente em lesões difíceis de caracterizar e em lesões ou condições potencialmente malignas em que a mucosa deve ser observada com regularidade e na sua globalidade durante um período de tempo normalmente longo. A maioria destas lesões pode permanecer vários anos na mucosa. O início do processo de malignização pode ser tardio e é imprevisível devendo, por isso, estes doentes ser vigiados [43]. Algumas destas condições apresentam probabilidade de malignização baixa, mas a sua persistência durante longos períodos da vida do doente obriga a um seguimento longo e eficaz. Acreditamos que sem a utilização da endoscopia de contacto estamos mais dependentes da realização de um maior número de biópsias, o que representa maior agressão, e ainda assim com menos segurança diagnóstica, por não ser possível controlar toda a extensão da mucosa em risco de malignização.

As lesões potencialmente malignas têm um risco de malignização que variam com o

seu tipo, podendo esse risco ir dos 2% a mais de 50%, como acontece com algumas eritroplasias [43,44,45,46]. A prevalência geral das lesões ou condições potencialmente malignas é de 1% a 5% na população geral [43,44]. Na nossa amostragem correspondiam a 86 (58,1%) lesões (n=148) o que revela um número significativo de doentes de risco que têm que ser seguidos durante um longo período de tempo.

A endoscopia de contacto, associada à observação macroscópica durante a consulta, representa um complemento essencial, principalmente quando discutimos a sua capacidade para diagnosticar malignidade. Os tumores malignos são por definição doenças celulares. Assim, ao realizarmos apenas uma observação macroscópica na consulta, estamos a decidir sobre a necessidade de realizar uma biópsia e sobre a sua localização, com base apenas numa informação macroscópica. Embora as alterações celulares se traduzam durante a sua evolução por lesões observáveis macroscopicamente, julgamos ser mais fiável observar a patologia na sua génese, ou seja, no âmbito microscópico e celular. Na verdade, ao não utilizarmos a endoscopia de contacto estamos a tomar uma decisão de âmbito microscópico, apoiados em informação que se baseia numa observação macroscópica. A utilização rápida e não invasiva de um endoscópio de contacto, ao detectar áreas de malignidade, vai permitir-nos, com base numa informação de carácter microscópico, responder às perguntas: “devo biopsar?” e “onde biopsar?”.

Outra das vantagens da endoscopia de contacto é poder ser utilizada para controlar margens de segurança cirúrgica e realizar verdadeiros exames extemporâneos, segundo alguns autores com capacidades iguais ou superiores às do exame extemporâneo [7]. Após a exérese cirúrgica podemos varrer toda a margem da excisão com o endoscópio de contacto e obter a primeira informação de retorno sobre a eficácia das margens de segurança que definimos. A determinação da área de segurança adjacente à lesão pode ser decidida com base numa informação associada entre a observação macroscópica e a imagem da endoscopia de contacto. Também aqui, esta informação complementar deverá ser sempre utilizada para decidir eventuais alargamentos da margem de segurança cirúrgica, decidida com base em critérios clínicos e nunca para a encurtar, contrariando esses mesmos critérios.

O resultado da associação da informação da clínica com a endoscopia de contacto deverá ser sempre obtido por reunião dos resultados de ambas as abordagens e nunca por intersecção. Garante-se assim a redução para o mínimo do número de casos positivos de malignidade que nos escapam. Com esta estratégia corremos apenas o risco de

se poderem obter alguns falsos positivos, ou seja, de serem detectados alguns casos aparentemente suspeitos de malignidade que não sejam posteriormente confirmados com o resultado anatomopatológico.

A gravação das imagens de endoscopia de contacto, obtidas em diferentes observações, podem ser arquivadas e incluídas no processo do doente, permitindo seguir a evolução da doença, também no âmbito celular.

O doente pode acompanhar a realização da endoscopia através da observação das imagens o que poderá, em alguns casos, motivá-los a abandonar alguns hábitos que podem ajudar a controlar e mesmo a prevenir o aparecimento da doença.

A realização da endoscopia de contacto não implica custos monetários significativos.

## LIMITAÇÕES DA ENDOSCOPIA DE CONTACTO NO DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE

Todas as técnicas têm limitações. As limitações da endoscopia de contacto são referidas nos estudos publicados e foram frequentemente discutidas nas comunicações que fizemos em cursos e congressos.

A limitação mais referida e também aquela que é, na generalidade, considerada a mais importante, é o facto de a endoscopia de contacto não conseguir observar a membrana basal de forma a determinar se existe invasão por células neoplásicas, distinguindo assim um tumor não invasivo (*in situ*) de um tumor invasivo. A endoscopia de contacto só consegue observar as células das camadas mais superficiais e embora permita a observação dos vasos subepiteliais, não consegue observar a membrana basal. Ressalte-se que mesmo que venha a ser possível no futuro, como técnica de abordagem vertical, é difícil avaliar algumas alterações da membrana basal. No entanto, alguns autores, nomeadamente Kumagai e a sua equipa, na área da gastroenterologia [20,21] defendem conseguir distinguir tumores não invasivos de tumores invasivos, com base no padrão vascular. Um dos estudos sobre a cavidade oral [29] que aborda apenas o padrão vascular como meio de diagnóstico, demonstra também progressos nesse sentido. Neste estudo, não testámos essa possibilidade estatisticamente, embora uma avaliação qualitativa nos sugira que algumas alterações do padrão vascular, nomeadamente, o aparecimento de vasos de maiores dimensões, de formas mais complexas e mais friáveis, com a detecção de glóbulos vermelhos

fora dos vasos, possa sugerir a existência de tumores invasivos, devido à existência de neoangiogénese.

Esta limitação, enquanto não for ultrapassada, impede a endoscopia de contacto de classificar os tumores quanto ao seu carácter de invasibilidade. No entanto, consideramos que sempre que há suspeita de malignidade deve realizar-se biópsia, com caracterização anatomopatológica que, em qualquer circunstância, a fará sempre com maior fiabilidade. Assim, esta que é a maior limitação assinalada à endoscopia de contacto, em nada diminui a sua capacidade de detectar malignidade como complemento da clínica e da Anatomia Patológica, que foi o objectivo principal que nos propusemos defender e testar.

O diagnóstico diferencial entre displasia ligeira a moderada constitui outra limitação, que advém do facto da endoscopia de contacto ser uma técnica de observação vertical. No entanto, neste estudo considerámos a displasia ligeira e moderada como lesão benigna e displasia grave como maligna. Os resultados apoiam a ideia de não existir limitação na detecção das displasias graves por endoscopia de contacto, pois são consideradas carcinomas *in situ* e, por isso malignas. As displasias ligeiras e moderadas são entendidas como benignas e, no estado actual do desenvolvimento da técnica, não existe uma vantagem adicional na aplicação da endoscopia de contacto para o diagnóstico diferencial entre elas. Em ambos os casos, os doentes portadores destas lesões devem ser seguidos em consulta de seguimento, onde deverão realizar a observação clínica clássica complementada por endoscopia de contacto.

É um facto que a técnica tem limitações. No entanto, atendendo a que a nossa proposta não é substituir a Anatomia Patológica pela endoscopia de contacto mas sim complementá-la, não podemos estabelecer uma comparação pura entre as capacidades das duas técnicas. Os resultados deste estudo demonstram que os objectivos principais da endoscopia de contacto no diagnóstico de malignidade não são comprometidos por não ser possível observar a membrana basal ou fazer o diagnóstico diferencial entre displasias simples e moderadas. O que se pretende é ajudar a identificar áreas de malignidade na mucosa bucal e a endoscopia de contacto revela-se, neste estudo, como tendo condições para complementar e reforçar a clínica e Anatomia Patológica nesse propósito.

Neste contexto, apresenta inclusivamente algumas vantagens, quando comparada com o exame anatomopatológico, porque implica menos biopsias, logo menos invasibilidade, e permite observar rapidamente toda a superfície da mucosa. Outra vantagem é o facto



do resultado ser realizado in loco, ser imediato, e permitir a obtenção da localização topográfica precisa das lesões. A classificação do tipo do tumor não deverá ser pedida à endoscopia de contacto. Esta será sempre realizada de uma forma muito mais eficaz pela anatomia patológica, justificando-se assim o conceito de complementaridade da tríade: clínica, endoscopia de contacto e Anatomia Patológica.

A impossibilidade de observar células do córion da mucosa por endoscopia de contacto, sendo apenas possível observar alguns dos seus vasos, não possibilita o diagnóstico de alguns tipos de tumores, como aconteceu neste estudo no caso falso negativo, um carcinoma mioepitelial. Esta é a limitação da técnica, que julgamos fazer mais sentido considerar no contexto dos objectivos propostos. No entanto, globalmente o efeito desta limitação acaba por ser muito restrito, dada a incidência muito baixa destes tumores (<1%) [85].

Identificámos outras limitações, estas com carácter absoluto, como o caso de doentes com alergia ao azul de metileno ou portadores de anemia hemolítica por deficiência hereditária da glucose-6-fosfato desidrogenase, habitualmente denominada de favismo. Estes doentes não podem realizar endoscopia de contacto com coloração por azul de metileno, podendo apenas realizar a observação directa dos vasos.

A existência de sangue no campo de observação torna muito difícil a obtenção de imagens por endoscopia de contacto, obrigando à interrupção do procedimento até se conseguir obter uma hemostase que permita continuar a observação. Normalmente, a aplicação de um vasoconstritor, um pouco de pressão ou frio local são suficientes para controlar estas pequenas hemorragias. Algumas lesões ulceradas ou infiltrativas muito friáveis, estão normalmente na origem destas situações. Para as evitarmos devemos começar a observação pela área aparentemente normal, adjacente à lesão e, ao chegar-mos ao limite da lesão começar por observar as áreas menos friáveis deixando para o fim as regiões mais instáveis em termos vasculares. O controlo da pressão da ponta do endoscópio é também muito importante e a sua mudança de posição deve ser realizada não por deslizamento mas por uma manobra de desencostar e voltar a encostar num ponto vizinho; o varrimento da área friável deve ser realizada de um modo tipo “picotado” em vez de deslizamento sobre a superfície.

A hiperqueratose da superfície da mucosa constitui igualmente uma limitação devido a impedir o acesso à observação das células nucleadas das camadas subjacentes. As tentativas de remoção mecânica ou química desta hiperqueratose, testadas em estudos anteriores, em mucosas com outras localizações, nunca se revelaram eficazes. Nestes

casos, a opção é observar as células sem núcleo da superfície por forma a conseguir informação válida ao diagnóstico e procurar pequenos grupos de células nucleadas que são frequentemente passíveis de ser encontradas. A avaliação do padrão vascular é igualmente muito útil. Nestes casos os vasos nem sempre se conseguem observar na área da lesão mas nas suas margens é sempre possível observar a microvascularização e recolher informação para realizar e validar o diagnóstico.

Outra limitação que encontramos referida nos estudos de S Dowthwaite *et al* [27] e Nobuo Saeki *et al* [26] foi a complexidade na obtenção de imagens de áreas como a língua, devido à dificuldade de imobilização do órgão. Na nossa opinião, esta não pode ser considerada uma limitação da técnica, pois a língua tem que ser sempre imobilizada pelo clínico que está a executar a endoscopia de contacto ou, eventualmente, por um ajudante. Estas áreas podem implicar uma realização mais demorada do exame mas dificilmente são um impedimento à sua efectivação. Os mesmos autores, principalmente Dowthwaite, referem ainda existirem áreas de difícil acesso para encostar o endoscópio de contacto [27]. Também aqui julgamos não haver limitação na prática; na nossa amostra não existiu nenhum caso em que não tivesse sido possível obter as imagens por dificuldade de acesso. No entanto, reconhecemos que a observação de algumas áreas do palato duro e da gengiva pode ser de mais difícil execução devido à irregularidade da superfície, associada à pouca elasticidade da mucosa. Alguns doentes podem ter também alguma dificuldade em permitir a observação dos bordos livres do palato mole, devido ao facto da superfície ser pouco estável e poder desencadear o reflexo de vômito. Estas são algumas excepções que podem dificultar uma boa observação mas que são quase sempre ultrapassáveis. Concordamos com estes autores quando defendem que existiria vantagem se o endoscópio de contacto fosse desenhado especificamente para o estudo da mucosa oral.

Dowthwaite *et al* [27] e Awadhesh Kumar Mishra *et al* [28] referem ainda o excesso de saliva como limitação para a obtenção de imagens por endoscopia de contacto. É um facto que o excesso de saliva dificulta a incorporação do corante pelas células e acelera a autolavagem da mucosa, obrigando a nova coloração. A produção e a acumulação de saliva são variáveis de doente para doente e, principalmente consoante o território em estudo, como descrevemos no capítulo da observação da mucosa normal. O importante é o reconhecimento desta situação e a realização de uma correcta remoção da saliva que permita uma observação normal. Não consideramos o excesso de saliva como uma limitação, mas sim um factor que pode aumentar o grau de dificuldade da execução da técnica. Reportamos como mais difícil de ultrapassar a circunstância oposta, que corresponde à existência de uma mucosa muito seca, muitas vezes associada a patologia

ou a condições iatrogénicas. Esta situação sim, pode ser uma limitação, obrigando a uma hidratação prévia com a aplicação de algumas gotas de soro fisiológico antes da realização da coloração e da observação.

A endoscopia de contacto, apesar de garantir uma boa discriminação núcleo/citoplasma, não permite distinguir os organitos citoplasmáticos pela inexistência de um corante específico. Não permitindo identificar, de forma diferencial, todos os tipos de células inflamatórias excepto as que são reconhecidas pela forma do núcleo.

A maioria das limitações que referimos são definidas por comparação com as capacidades do exame anatomopatológico. Não existindo, no entanto, o objectivo de substituir a avaliação histopatológica pela endoscopia de contacto, não tem qualquer sentido exigir que os dois exames tenham as mesmas capacidades. Quando pretendemos que tenham actuação complementar também deverão ter competências complementares, daí se inferir que grande parte destas limitações não representa nenhum constrangimento para a realização do diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto.

## **AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADE POR ENDOSCOPIA DE CONTACTO REALIZADO POR CLÍNICOS SEM EXPERIÊNCIA COM A TÉCNICA.**

As respostas obtidas pelos clínicos, após a realização de um curso teórico-prático de três horas vão no sentido da endoscopia de contacto poder vir a ser utilizada de uma forma mais fácil pelos clínicos, sem o receio de uma curva de aprendizagem longa e difícil, associada a erros de diagnóstico que possam ser comprometedores para o doente. Entre os 12 clínicos, apenas 1 teve uma taxa de diagnósticos acertados inferior a 80% e 3 deles acertaram em todos os diagnósticos (10/10 100%). Consideramos que os casos tinham um grau de dificuldade entre o fácil e o moderadamente fácil. No entanto, ainda que por excesso possamos considerar que os casos eram todos de fácil diagnóstico, o facto de termos obtido este resultado apenas com três horas de preparação e treino, não pode deixar de ser considerado como bom e motivador para estimular a utilização da endoscopia de contacto por clínicos.

Analisando as respostas por caso clínico, verificamos que 3 casos foram bem diagnosticados por todos os clínicos e 1 dos casos só foi correctamente diagnosticado por 58% (7/12) dos clínicos, o que revela um grau de dificuldade aparentemente equilibrado entre o fácil e o moderadamente fácil. Mesmo tendo em consideração que estamos a

falar de uma amostra de dimensões reduzidas, estes resultados vão no sentido de não ser necessário uma curva de aprendizagem longa, nem uma preparação específica em histologia para que os clínicos possam realizar o diagnóstico de malignidade na mucosa oral por endoscopia de contacto.

Quando perguntámos directamente se julgavam ser necessário conhecimento de histologia específicos, 11 dos clínicos (11/12) responderam que seria apenas necessário conhecimentos histológicos básicos ou médios. Entre os 12 inquiridos, 7 revelaram achar que o risco para o doente por um diagnóstico de endoscopia de contacto errado era nulo ou quase nulo. Os outros 5 (5/12) consideraram existir um risco moderado, o que revela ainda algum receio pela realização da técnica mas, simultaneamente, uma aparente abertura para a sua realização sem receio excessivo.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

A endoscopia de contacto tem vários potenciais vectores para a sua evolução, uns técnicos e outros humanos. Julgamos fundamental que os clínicos possam testar a técnica e esperamos que os resultados deste estudo possam ajudar a tomar essa decisão. Só com várias equipas multicêntricas a acreditar que podem tirar proveito prático na clínica diária poderá haver progressos. Julgamos que é necessária uma curva de aprendizagem, ainda que mais curta do que possa parecer, principalmente, se o objectivo for apenas detectar malignidade.

Os resultados deste estudo ajudam a demonstrar que o diagnóstico de malignidade por endoscopia de contacto é eficaz, simples e com pouco risco para o doente em caso de erro de diagnóstico, quando a técnica é utilizada como complemento e não como substituição da clínica e da Anatomia Patológica.

Muito há a fazer no domínio técnico-científico para melhorar a capacidade diagnóstica da endoscopia de contacto, como conseguir estabelecer diagnósticos de outras entidades nosológicas para além dos tumores malignos ou melhorar a informação nos casos de neoplasias malignas. Para que esses objectivos sejam alcançados deverá evoluir-se ao nível dos corantes, com o desenvolvimento de novas substâncias e a sua associação a novos marcadores, alguns do domínio da biologia molecular. Podemos evoluir no domínio do instrumental, criando novos endoscópios de contacto, mais funcionais, com melhor resolução e fisicamente mais adaptados para o estudo da boca.

Podemos igualmente progredir no âmbito da interpretação de imagens, com uniformização dos critérios de diagnóstico, para os quais este estudo contribui. O investimento em análise informatizada das imagens talvez possa ajudar a avaliar, de forma menos subjectiva, alguns achados celulares e vasculares como, por exemplo, a intensidade de coloração dos núcleos das células.

Acreditamos que este estudo pode igualmente lançar ideias para novos trabalhos a realizar com as condições técnicas actuais, como estudos dirigidos para a avaliação da eficácia prática da observação pela endoscopia de contacto durante a consulta de seguimento, na detecção de recidivas de tumores malignos e na detecção da malignização de lesões ou condições potencialmente malignas.

Estamos convictos de que o desenvolvimento e a generalização da aplicação clínica da endoscopia de contacto está dependente da sua aceitação pelos clínicos, sem receio de curvas de aprendizagem longas ou penosas. O anatomopatologista dificilmente irá adoptar esta técnica porque não observa directamente o doente, logo, não está sujeito à pressão do imediatismo do diagnóstico, e dispondo de tempo e de uma amostra de tecido, deixa de existir espaço para a endoscopia de contacto. Outra forma do anatomopatologista intervir seria deslocar-se à consulta ou receber as imagens à distância para fazer o diagnóstico. No entanto, para executar esta tarefa, também precisaria de formação dado que as imagens de endoscopia de contacto não são sobreponíveis às obtidas pelas técnicas clássicas de histologia.

O futuro terá de passar pela utilização da endoscopia de contacto pelo clínico, integrando naturalmente a técnica na consulta externa. O endoscópio de contacto deverá estar disponível de uma forma tão natural no instrumental de Otorrinolaringologia e Medicina Oral como o dermatoscópio na consulta de Dermatologia.



CAPÍTULO 5

# BIBLIOGRAFIA





# BIBLIOGRAFIA

- [1] Hamou J. Hysteroscopy and microcolpohysteroscopy. In Text and atlas Norwalk Conn: Apleton and Lange;1991.
- [2] L'Estrange P. Bevenius J. Williams L. Intraoral application of microcolpohysteroscopy. A new technique for clinical examination of oral tissues at high magnification. Oral surgery, oral medicine and oral pathology. 1989; 67: 282-285.
- [3] Andrea M. Dias O. Santos A. Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. Ann Otl Rhinol Laryngol. 1995; 104(5): 333-9.
- [4] Andrea M. Dias O. Macor C. Santos A. Varandas J. Contact endoscopy of the nasal mucosa. Acta Otolaryngol (Stockh). 1997 Mar; 117(2): 307-11.
- [5] Andrea M. Dias O. Santos A. Contact endoscopy of the vocal cord: normal and pathological patterns. Acta Otolaryngol (Stockh). 1995; 115: 314-316.
- [6] Carriero E. Galli J. FAdda G. Di Girolando S. Ottaviani F. Paludetti G. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2000; 257 (2): 68-71.
- [7] Cikojevic D. Gluncic I. Pesutic-Pisac. Comparison of contact endoscopy and frozen section histopathology in the intra-operative diagnosis of laryngeal pathology. The journal of Laryngology & Otology. 2007; vol 122 issue 08 836-839.
- [8] Arens C. Dreyer T. Glanz H. Malzahn K. Compact endoscopy of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2003; vol112 nº2 113-119.
- [9] Sone M. Sato E. Hayashi H. Fujimoto Y. Nakashima T. Vascular evaluation in laryngeal diseases comparison between contact endoscopy and laser doppler flowmetry. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006; 132: 1371-74.
- [10] D'Avila J. S. Estudo comparativo da microvascularização das cordas vocais humanas acometidas por cisto e reação nodular contra-lateral, in vivo, através das endoscopias rígida e de contacto da laringe. São Paulo, 2002.

- [11] Dedivitis R.A. Pfuetzenriter J.R. Guimaraes A.V. Contact endoscopy of the larynx as an auxiliary method to the surgical margins in frontolateral laryngectomy. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009; 29: 16-20.
- [12] Xiaiming H. Haiqiang M. Manquan D. Jianyong S. Yong S. Kla L. Xiaoman L. Tengbo H. Examination of nasopharyngeal epithelium with contact endoscopy. *Acta Otolaryngol (Stock).* 2001; 121: 98-102.
- [13] Pak M.W. To K.F. Leung S.F. Van Hasselt C.A. In vivo diagnosis of nasopharyngeal carcinoma using contact rhinoscopy. *Laryngoscope.* 2001; 111: 1453-1458.
- [14] Pak M.W. To K.F. Leung S.F. Van Hasselt C.A. In vivo diagnosis of persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma by contact endoscopy. *Laryngoscope.* 2002 Aug; 112 (8 Pt 1): 1459-66.
- [15] Romano F.R. Voegels R.L. Goto E.Y. Prado F.A. Butugan OAm J. Nasal contact endoscopy for the in vivo diagnosis of inverted Schneiredian papilloma and unilateral inflammatory nasal polyps. *Rhinol.* 2007 Mar-Apr; 21 (2): 137-44.
- [16] Folz B.J. Werner J.A. Contact endoscopy of the nose in patients with Rendu-Osler Weber syndrome. *Auris Nasus Larynx.* 2007 Mar; 34 (1): 45-8 Epub 2006 Nov 28.
- [17] Kumagai Y. Kawada K. Yamazaki S. Iida M. Ochial T. Momma K. Odajima H. Kawachi H. Nemoto T. Kawano T. Takubo K. Endoscopic Observation of esophageal squamous cell carcinoma. *Digestive endoscopy.* 2010; 22: 10-16.
- [18] Fujishiro M. Takubok K. Sato Y. Kaise M. Niwa Y. Kato M. Muto M. Potential and present limitations of endocytoscopy in the diagnosis of oesophageal squamous cell carcinoma; a multicenter ex vivo pilot study. [www.giejournal.org](http://www.giejournal.org) Gastro-intestinal endoscopy. vol 66 n°3 2007: 551-5.
- [19] Inoue H. Kazawa T. Sato Y. Satodate H. Sasajima K. Kudo S. Shiokawa A. In vivo observation of living cancer cells in the esophagus, stomach and colon using cateter-type contact endoscope- endo-cytoscopy system. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 14. 2004; 589-594.

- [20] Kumagai Y. Iida M. Yamazaki S. Magnifying endoscopic observation of the upper gastrointestinal tract. *Digestive endoscopy*. 2006; 18: 165-172.
- [21] Kumagai Y. Kawada K. Yamazaki S. Iida M. Ochiai T. Kawano T. Takubo K. Prospective replacement of magnifying endoscopy by a newly developed endocytoscope the GIF- Y 0002. *Diseases of the esophagus*. 2010; 23: 627-632.
- [22] Sasajima K. Kudo S. Inoue H. Takeuchi T. Kashida H. Hidaka E. Kawachi H. Sakashita M. Tanaka J. Shiokawa A. Real time in vivo histology of colorectal lesions when using the endocytoscopy system. *Gastrointest endoscopy*. vol 63 nº7 2006: 1010-1017.
- [23] Dedivitis R.A. Guimarães A.V. Contact endoscopy for intraoperative parathyroid identification. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003 Mar; 112 (3): 242-5.
- [24] Eguchi H. Ishikawa O. Ohigashi H. Takahashi H. Ohue M. Takenaka A. Tomita Y. Yano M. Real-time and the in vivo detection of minute cancer invasion to the portal-superior mesenteric vein using contact endoscopy during a pancreatic cancer resection. *The American Journal of Surgery*. 2009; 198: e66-e71.
- [25] Pellucchi S. Bianchini C., Travagli M., Pastore A. Contact endoscocopy of the oral mucosa: preliminary results. *Acta otorhinolaryngologica italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorrinolaringologia e chirurgia cervico-facciale* 2007; 27: 59-61.
- [26] Saeki N. Tsuzuki K. Negoro A. et al. Utility of real-time using contact endoscopy for oral and lingual diseases. *Auris, nasus, larynx*. 2011; 38: 233-239.
- [27] Dowthwaite S. Szeto C. Wehrli B. Daley T. Whelan F. Franklin J. Nichols A. Yoo J. Fung K. Contact endoscopy as novel technique in the detection and diagnosis of oral cavity and oropharyngeal mucosal lesions in the head and neck. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2014; 128: 147-152.
- [28] Col Awadhesk Kumar Mishra, Col Ajith Nilakantan, Col Kavita Sahai, Col Rakesh Datta, Col Ajay Malik. Contact Endoscopy of mucosal lesions of oral cavity- Preliminary experience *Medical Journal Armed Forces India*. 2014, 70: 257-263.
- [29] Carta F. Sionis S. Cocco D. Gerosa C. Ferreli C. Puxeddu R. Enhanced contact endoscopy for the assessment of the neoangiogenetic changes in precancerous and cancerous lesions of the oral cavity and oropharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015.

- [30] Diana V. Messadi. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. International Journal of Oral Science. 2013; 1674: 2818-13.
- [31] Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. Head & Neck Oncology. 2009; 1:5.
- [32] Ho M.W. Field E.A. Field J.K. Risk J.M. Rajlawat B.P. Rogers S.N. Steele J.C. Triantafyllou A. Woolgar J.A. Lowe D. Shaw R.J. Outcomes of oral squamous cell carcinoma arising from oral epithelial dysplasia: rationale for monitoring premalignant oral lesion in a multidisciplinary clinic. British J. Oral and Maxillofacial Surgery. 2013.
- [33] Epstein J. B. Zhang L. Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. Journal of the Canadian Dental Association. 2002; 68: 617-621.
- [34] Katchburian E. Arana V. (2012) Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- [35] Sapp J.P. Eversole L.R. Wysocki G.P. (2006) Patología Oral y Maxilofacial contemporânea. Madrid, Elsevier.
- [36] Avery J.K. Chiego D.J. jr. (2007) Principios de Histología y Embriología Bucal com orientación clínica. Espanha, Elsevier.
- [37] Bath-Balogh M. Fehrenbach M.J. (2008) Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofacias. Barrueri, SP:Manole.
- [38] Kierszenbaum A:L (2008). Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier.
- [39] Alberts B. Bray D. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. Walter P. (2004) Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre : Artmed editora.
- [40] Junqueira L.C. Carneiro J. (2011) Histologia Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- [41] Young B. Lowe J.S. Stevens A. Heath J.W. (2007). Wheater Histologia Funcional : texto e atlas em cores. Rio de Janeiro: Elsevier.

- [42] Avery J.K. (2001). Oral Development and Histology. Nove York: Thieme.
- [43] Warnakulasuriya S. Johnson N.W. van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignante disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 2007; 36: 575-580.
- [44] Mortazavi H. Baharvand M. Mehdipour M. Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities. J Dent Res Dent Clin Dent Prospect 2014; 8(1): 6-14.
- [45] George A. BSS, SS, Varghese SS, Thomas J, Gopakumar D, Mani V. Potentially malignant disorders of oral cavity. OMPJ 2011; 2: 95-100.
- [46] Amagasa T. Oral premalignant lesions. Int Clin Onco 2011; 16: 1-4.
- [47] Saito T. Sugiura C. Hirai A. et al. High Malignant transformation rate of widespread multiple oral leukoplakia. Oral Dis 1999; 5: 15-19.
- [48] Hamadah O. Goodson M.L. Thomson P.J. Clinicopathological behavior of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. Br J Oral Maxillofac Surg 2010; 48: 503-506.
- [49] Lee J.J. Hong W.K. Hittlelam W.N. et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. Clin Cancer Res 2000; 6: 1702-1710.
- [50] Thomson P.J. Hamadah O. Cancerisation within the oral cavity: the use of 'field mapping biopsies' in clinical management. Oral Oncol 2007; 43: 20-26.
- [51] Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. Brit Rev Oral Biol Med 2003; 14: 47-62.
- [52] Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. J Pathol 2001; 194: 294-7.
- [53] Bouquot J.E. Gorlin R.J. Leukoplakia, lichenplanus, and other oral keratoses in 23.616 white Americans over the age of 35 years. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 61: 373-381.

- [54] Neville B.W. Damm D.D. Allen C.R. Bouquot J.E. Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. P. 316-376, 644-697.
- [55] Gupta P.C. Mehta F.S. Daftary D.K. et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980; 8:287-333.
- [56] Pindborg J.J. Reichart P.A. Smith C.J. Van der Waal I. World Health Organization International Histological Classification of Tumors. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin: Springer, 1997.
- [57] Meghji S. Warnakulasuriya S. Oral submucous fibrosis: an expert symposium. *Oral Dis* 1997; 3: 276-91.
- [58] Zain R.B. Ikeda N. Gupta P.C. et al. Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits: consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-27, 1996. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 1-4.
- [59] van der Meij E.H. Schepman K-P. van der Wall I. The possible malignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003; 96: 164-71.
- [60] Silverman S. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 1286-8.
- [61] Ma D. Dai G. Guo C. Carcinoma of the lips developing in discoid lupus erythematosus. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999; 34: 13-5.
- [62] Liu W. Shen Z.Y. Wang L.J. Hu Y.H. Shen X.M. Zhou Z.T. Li J. Malignant potential of oral and labial chronic discoid lupus erythematosus: a clinicopathological study of 87 cases. *Histopathology* 2011; 59: 292-8.
- [63] Thomson P. Oral Precancer. Diagnosis and management of potentially malignant disorders. Wiley-Blackwell. 2012. p.48-73.
- [64] Spornraft-Ragaller P. Boashie U. Friedrich K. Lehmann U. Meurer M. Late secondary syphilis with ulceration of the tongue during HIV coinfection: case report. *Hautarzt* 2006; 57:1005-8.



- [65] Greenberg M.S. Glick M.G. Burket's oral medicine: diagnosis and treatment. 10th ed, Ontario, BC Decker, 2002. p.85-93.
- [66] Oliveira T.M. Sakai V.T. Candido L.A. Silva S.M. Machado M.A. Clinical management of epidermolysis bullosa dystrophica J Appl Oral Sci 2008; 16:81-5.
- [67] Chidzonga M.M. Mahomva L. Makunike-Mutasa R. Masanganise R. Xeroderma pigmentosum: a retrospective case series in Zimbabwe. J Oral Maxillofac Surg 2009; 67:22-31.
- [68] Sánchez Yus E. Simón P. Requena L. Abrojo P. de Eusébio E. Solitary keratoacanthoma: a self-healing proliferation that frequently becomes malignant. Am J Dermatopathol 2000;22: 3015-10.
- [69] Salum F.G. Martins G.B. de Figueiredo M.A. Cherubini K. Yurgel L.S. Torres-Pereira C. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. Braz Dent J 2006; 17: 161-5.
- [70] Montebugnoli L. Gissi D.B. Marchetti C. Fascini M.P. Multiple squamous cell carcinomas of the oral cavity in a young patient with graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. Int J Oral Maxillofac Surg 2011; 40: 556-8.
- [71] Ferlay J. Bray F. Pisani P. Parkin D.M. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. In IARC Cancer Base No. 5. Version 2.0 Lyon: IARC Press. 2004.
- [72] La Vecchia C.L. Lucchini F. Negri E. Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. Oral Oncol. 2004 Apr; 40(4):433-9.
- [73] Boyle P. Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol 2005;16: 481–8.
- [74] Remontet L. Buemi M. Velten M. Jouglé E. Esteve J. Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Collective expert evaluation report. Lyon: INSERM; 2002.
- [75] Black R.J. Bray F. Ferley J. Parkin D.M. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. Eur J Cancer 1997;33:1075–107.

- [76] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009; 45: 309-316.
- [77] Howlader N. Noone A.M. Krapcho M. Miller D. Bishop K. Altekruse S.F. Kosary C.L. Yu M. Ruhl J. Tatalovich Z. Mariotto A. Lewis D.R. Chen H.S. Feuer E.J. Cronin K.A. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, section 20. National Cancer Institute, Bethesda. MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/), based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. Section 20: Oral cavity and pharynx.
- [78] Llewellyn C.D. Johnson N.W. Warnakulasuriya K.A.A.S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001; 37:401–18.
- [79] Shiboski C.H. Schmidt B.L. Jordan R.C. Tongue and tonsillar carcinoma: increasing trends in the US population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103: 1843–9.
- [80] Warnakulasuriya S. Mak V. Moller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol* 2007;43: 982–6.
- [81] Thames Cancer Registry. Cancer inequalities in London 2000–2004. London: TCR; 2007.
- [82] Llewellyn C.D. Linklater K. Bell J. Johnson N.W. Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004;40:304–13.
- [83] Llewellyn C.D. Johnson N.W. Warnakulasuriya K.A.A.S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 2004;33:525–32.
- [84] Ministry of Health. National Cancer Control Programme, Sri Lanka. Cancer incidence data: Sri Lanka year 2000. 6th Publication. Maharagama: NCCP; 2005.
- [85] Johnson NW. Orofacial neoplasms: global epidemiology, risk factors and recommendations for research. *Int Dent J.* 1991 Dec; 41(6):365-75
- [86] La Vecchia C. Tavani A. Franceschi S. Levi F. Corrao G. Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33:302-12.

[87] Blot W.J. McLaughlin J.K. Winn D.M. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48: 3282-7.

[88] International Agency on Research on Cancer. IARC monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut related nitrosamines. IARC. 2004. Vol 85.

[89] Herrero R. Castellsague X. Pawlita M. et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency on Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 1772-83.

[90] Meyer M.S. Joshipura K. Giovannucci E. Michaud D. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease and cancer. *Cancer Causes Control.* 2008.

[91] Warnakulasuriya S. Jonhson N.W. van der Wall I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 575-80.

[92] Warnakulasuriya S. Food, nutrition and oral cancer. In: Wilson M, editor. *Food constituents and oral health. Current status and future prospects.* Woodhead Publishing. 2009 Apr; 273-295.

[93] Rubin P.H. *Clinical oncology. A multidisciplinary approach to physicians and students.* 7th ed. Philadelphia: Saunders; 1993.

[94] Gelband H. Jha P. Sankaranarayanan R. et al. *Cancer: Disease control priorities.* Chapter 5: Oral Cancer: Prevention, Early Detection, and Treatment. The international Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank. 2015 Nov.

[95] McGurk M. Chan C. Jones J. O'Reagan E. Sherriff M. Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Aug; 43 (4): 281–4.

[96] Llewellyn C.D. Johnson N.W. Warnakulasuriya S. Factors associated with delay in presentation among younger patients with oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jun; 97(6):707–13.

[97] Warnakulasuriya K.A, Harris C.K, Scarrot D.M, et al. An alarming lack of public awareness towards oral cancer. *Br Dent J* 1999 Sep 25;187(6):319-22.

- [98] Napier S.S. Speight P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008 Jan; 37(1):1-10.
- [99] Samet J.M. The health benefits of smoking cessation. *Med Clin North Am.* 1992 Mar;76 (2): 399–414.
- [100] Warnakulasuriya S. Sutherland G. Scully C. Tobacco, oral cancer and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005 Mar; 41(3):244–60.
- [101] Reichart P. Oral cancer and precancer related to betel and miang chewing in Thailand: a review. *J Oral Pathol Med* 1995 Jul; 24(6): 241–3.
- [102] Harris C.K. Warnakulasuriya K.A.A.S. Cooper D.J. Peters T.J. Gelbier S. Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in South London. *J Oral Pathol Med* 2004 May; 33(5):253-9.
- [103] British Dental Association. BDA occasional paper No. 6. Opportunistic oral cancer screening: a management strategy for dental practice; 2000 Apr;1-36.
- [104] Seoane Lestón J. Diz Dios P. Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):418-22.
- [105] Closman J.J. Schmidt B.L. The use of cone beam computed tomography as an aid in evaluating and treatment planning for mandibular cancer. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Apr; 65(4): 766-71.
- [106] Subramanian S. Sankaranarayanan R. Bapat B. Somanathan T. Thomas G. Mathew B. Vinoda J. Ramadas K. Cost-effectiveness of oral cancer screening: results from a cluster randomized controlled trial in India. *Bull World Health Organ.* 2009 Mar; 87 (3): 200-6.
- [107] Van der meij E.H. Bezemer P.D. van der Waal I. Cost-effectiveness of screening for the possible development of cancer in patients with oral lichen planus. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002 Oct; 30 (5): 342-51.
- [108] Speight P.M. Palmer S. Moles D.R. Dower M.C. Smith D.H. Henriksson M. Augustovski F. The cost-effectiveness of screening for oral cancer in primary care. 2006 Apr; 10 (14):1-144, iii-iv.

- [109] Dedhia R.C. Smith K.J. Johnson J.T. Roberts M. The cost-effectiveness of community-based screening for oral cancer in high-risk males in the United States: a Markov decision analysis approach. *Laryngoscope*. 2011 May; 121(5): 952-60.
- [110] Boulais N. Misery L. Merkel cells. *American Academy of Dermatology* published online. April 2007; 147-163
- [111] Breathnach A. S. Robins J. Ultrastructural observations on Merkel cells in human foetal skin. *J.Anat.*106. 1970; 411-419.
- [112] Ingrid M. Marion R. Johanna M. B. Ann-Christin E. Pia H. Roland M. Human Merkel cells: Aspects of cell biology, distribution and functions. *European Journal of Cell Biology*. 2005; 84: 259-271.
- [113] Hartschuh W. Wheile E. Reineche M. The Merkel cell. *Biology of the Integument*. Springer, Berlin. 1986; Vol.2: 606-602.
- [114] Hashimoto K. Fine structure of Merkel cell in human oral mucosa. *J. Invest. Dermatol*. 1972; 58: 381-387.
- [115] Winkelmann R. K. Breathnach A.S. The Merkel cell. *J. Invest. Dermatol*. 1973; 60: 2-15.
- [116] Tachibana T. Endoh M. Nawa T. Immunohistochemical expression of G-protein alpha-subunit isoforms in rat and monkey: Merkel cell-neurite complexes. *Histochem. Cell Biol*. 2001; 116: 205-213.
- [117] Uchigasaki S. Suzuki H. Inoue K. Merkel cells in the vellus hair follicles of human facial skin: a study using confocal laser microscopy. *J. Dermatol*. 2004; 31: 218-222.
- [118] Memberg S.P. Hall A.K. Proliferation, differentiation and survival of rat sensory neuron precursors in vivo require specific trophic factors. *Mol Cell Neurosci*. 1995; 6: 323-35
- [119] Szeder V. Grim M. Kucera J. Sieber-Blum M. Neurotrophin-3 signaling in mammalian Merkel cell development. *Dev Dyn*. 2003; 228: 623-9.
- [120] Keimm R.F. Davis B.M. Woodbury C.J. Albers K.M. Nt3 expressed in skin causes enhancement of Merkel Cells. *J. Comp. Neurol*. 2004; 471: 352-60.

[121] Keller R. Dendritic cells: their significance in health and diseases. *Immunol Let.* 2001; Vol.78: 193-202.

[122] Difrancò C.F. et al. Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J. Periodontol.* Jan 1985; Vol 56: 48-54.

[123] Ségier S. Godeau G. Briuse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and langerhans cells in healthy and disease human gingival tissues. *Arch Oral Bio.* Jun 2000; vol.45: 44-52.

[124] Hart D.N.J. Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *J Amer Soc Hematol.* Nov 1997; vol.90 nº9: 3245-3287.

[125] Aleotti A. et al. Bierbeck granules: contribution to the comprehension of intracytoplasmatic evolution. *J. Sumicrosc Cytol Pathol.* 1998; vol.30: 295-298.

[126] Le Dóvarin N.M. Quail-chick chimeras, a tool to study the development of the peripheral nervous system. *Genetic approaches to development neurobiology*, Ed. Y. Tsukada, Springer-Verlag. 1982; 121-128.

[127] De Matos P. Tyler D. Seigler H.F. Mucosal melanoma of the female genitalia. A clinicopathologic study at Duke University Medical Centre. 1998; 124: 38-48.

[128] Seiji M. Sub cellular particles and melanin formation in melanocytes. *Advances in biology of skin*. Pergamon Press. New York. 1980; 189-222.

